UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PENETRATIONS-VERMITTELNDE WIRKUNG VON DIMETHYL-SULFOXYD FÜR VERSCHIEDENE ANTIBIOTICA AN DER EUTERHAUT VON KÜHEN

EVI ENGELHARDT-HOFMANN

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546003_0015

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik

der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. hc. W. Baier

Arbeit unter der Leitung von Abt.-Vorsteher Prof. Dr. K. Walser

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PENETRATIONSVERMITTELNDE WIRKUNG VON DIMETHYL-SULFOXYD FÜR VERSCHIEDENE ANTIBIOTICA AN DER EUTERHAUT VON KÜHEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

München

von

Evi Engelhardt-Hofmann

aus

Sulzbach-Rosenberg

München 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent:	Prof. Dr. K. Walser
Korreferent:	Prof. Dr. A. Schmid
Tag der Promotion:	5. 2. 1971

Meinen Eltern in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG 1

II LITERATUR 3

A) Entdeckung von Dimethyl-Sulfoxyd (DMSO) 3

B) Herstellung und technische Daten 4

1. Herstellung 4

2. Chemisch-physikalische Eigenschaften 4

3. Physikalische Konstanten 5

C) Pharmakologische Eigenschaften 5

1. Permeabilitätserhöhung 5

2. Potenzierende Wirkung 6

3. Analgetische Wirkung 7

4. Antiphlogistische Wirkung 8

5. Bakteriostatische Wirkung 9

6. Fungistatische Wirkung 9

7. Sedative Wirkung 9

8. Diurese-Effekt 10

D) Wirkungen von DMSO an der Haut des Menschen 10

1. Der Mechanismus der Permeabilitäts-veränderung 10

2. Penetrationstiefe und Penetrationsweg 13

3. DMSO als "Carrier" in Abhängigkeit von den einzuschleusenden Stoffen 15

4. Toxizität und Nebenwirkungen 17

5. Wirkung von DMSO an der Euterhaut und im Euter von Kühen und Schafen 22

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN 27

A) Methodik 27

1. Geprüfte Antibiotica 27

2. Lösungsvermögen der einzelnen Antibiotica in DMSO 27

3. Versuchsanordnung 29

B) Ergebnisse 32
1. Untersuchungen mit Aureomycin 32
2. Untersuchungen mit Streptomycin 35
3. Untersuchungen mit Erythromycin 37
4. Untersuchungen mit Mamyzin 42
5. Zusammenfassung der Ergebnisse 57

C) Diskussion 58

D) Zusammenfassung 60

IV LITERATURVERZEICHNIS 62

Lebenslauf 68

I EINLEITUNG

Dimethyl-Sulfoxyd, eine Verbindung, die 1867 von Alexander SAYTZEFF gefunden wurde und deren für die Medizin wichtige Eigenschaften 1963 von HERSCHLER erkannt wurden, ist nach wie vor von großem Interesse für die Human- und Veterinärmedizin.

Nach den ersten Mitteilungen von JACOB und Mitarbeitern im Jahre 1964 folgte eine ganze Reihe von Versuchen an Mensch und Tier, welche die damals genannten Eigenschaften des Dimethyl-Sulfoxyds (DMSO), nämlich penetrationsfördernd, analgetisch, antiphlogistisch, neuroplegisch und teilweise bakteriostatisch und fungistatisch, bestätigen konnten. Ferner konnte am Menschen nachgewiesen werden, daß DMSO bei kutaner Applikation in der Lage ist, Kalkablagerungen im Bereich des Bewegungsapparates abzubauen.

Nebenwirkungen und Toxizität des DMSO sind erwiesenermaßen außerordentlich gering. Die Veränderungen an der Linse, die beim Tier, nicht aber beim Menschen, beobachtet wurden, sind reversibel. Es ist also möglich, DMSO allein oder in Kombination mit anderen Präparaten, wo es dann als "Carrier" wirkt, über längere Zeit hinweg zu verabreichen.

Für die Tiermedizin und hier wiederum vor allem für die Mastitis-Therapie erscheint die penetrationsfördernde und "Carrier" -Eigenschaft des DMSO von Bedeutung. Es bietet sich hier eine Möglichkeit, die Entzündungsherde auf kutanem Wege therapeutisch anzugehen, da die intrazisternale Applikation vor allem bei chronischen Mastitiden, wo die Lumina der entzündeten Euterviertel durch Entzündungsprodukte und nekrotische Gewebsstücke verstopft sind, vielfach ohne Erfolg blieb. Anknüpfend an Versuche, welche das Penetrationsvermögen von Penicillin

durch die Euterhaut mit Hilfe von DMSO am gesunden, laktierenden Euter der Kuh prüften, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Frage, ob auch noch andere, in der Mastitis-Therapie verwendete Antibiotica in der Lage sind, auf die gleiche Weise die Euterhaut zu durchdringen und im Eutergewebe einen therapeutisch wirksamen Antibiotica-Spiegel zu erzeugen.

II LITERATUR

A) Entdeckung von Dimethyl-Sulfoxyd

Der russische Chemiker Alexander SAYTZEFF (30) synthetisierte im Jahre 1867 erstmals das Dimethylsulfoxyd, den einfachsten Vertreter der Sulfoxyde (R - SO - R). Erst viel später fand diese interessante Verbindung Anwendung als Lösungsmittel in der Chemiefaser-Industrie, als Extraktionsmittel in der Petrolchemie und als Reaktionsmedium in der pharmazeutischen Industrie. Man stellte eine starke lytische Eigenschaft des Dimethyl-Sulfoxyds (DMSO) fest, welche auf die relativ hohe Polarität, die Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken sowie auf den breiten Bereich des flüssigen Aggregatzustandes zurückzuführen war (SCHEFFLER, 31).

Weiter fand man, daß DMSO sehr stark hygroskopisch ist und sogar einer wässrigen Lösung von Kalium-Hydroxyd, einem handelsüblichen Dehydrierungsmittel, Wasser zu entziehen vermag (JACOB et al., 16). Man fand, daß DMSO Baumrinden durchdringt und sich im Gefäßsystem der Pflanzen verteilt. Dies machte man sich zunutze und verwendete DMSO bei der Schädlingsbekämpfung. GARREN (6) ermittelte die Verteilung von DMSO in Pflanzen, indem er an einem Birnbaum und Erdbeerpflanzen, die mit radioaktivem Schwefel bzw. radioaktivem Phosphor begossen wurden, die Radioaktivität in den Blättern mittels eines Geiger-Müller-Zählrohres maß. Ferner wurde mit Hilfe von DMSO ein wirksamer Spray zur Bekämpfung der Eisenchlorose entwickelt, einer Mangelkrankheit, wie sie Pflanzen zeigen, die auf alkalinen Kalkböden wachsen (LEONARD, 22).

Man schloß aus diesen Versuchen, daß DMSO eine Permeabilitätssteigerung der pflanzlichen Zellen bewirkt. HERSCHLER (12) stellte in neuerer Zeit dieselbe Eigenschaft

auch bei tierischem und menschlichem Gewebe fest. Er konnte mit DMSO eine Erhöhung der Penetration von Farbstoffen, Antibiotica und Fungiziden erreichen. Hier begannen die bis heute andauernden, umfangreichen pharmakologischen und klinischen Untersuchungen. Die ersten grundlegenden Veröffentlichungen darüber brachten ROSENBAUM und JACOB 1964 (28), KLIGMAN (20) und HERSCHLER und JACOB (12). Sie gaben einen Umriß der weitläufigen Möglichkeiten auf medizinischem, aber auch auf landwirtschaftlichem Gebiet, die in DMSO lagen und die es näher zu erforschen galt.

B) Herstellung und technische Daten von DMSO

1. Herstellung

Die technische Darstellung von DMSO erfolgt von DMS aus, welches mit Hilfe von Stickoxyden als Katalysator über Luft- und Sauerstoffzufuhr oxydiert wird. DMSO wird bei der Zellstoff-Fabrikation aus vorkonzentrierten Schwarzlaugen nach Erhitzen in Gegenwart von S, oder aus Methanol oder Dimethyläther und Schwefelwasserstoff durch katalytische Synthese gewonnen. Das für pharmazeutische Zwecke notwendige reine DMSO erhält man durch sorgfältiges Fraktionieren im Vakuum (SCHEFFLER, 31).

2. Chemisch-physikalische Eigenschaften von DMSO

DMSO ist klar, farblos und in 100%ig reiner Form auch geruchlos. Es schmeckt schwach bitter. Beim Abkühlen erstarrt es zu einer kristallinen Masse. Die Kristalle sind monoklin. DMSO ist stark hygroskopisch und kann demzufolge bei 20° C und unter normalen atmosphärischen Bedingungen (65 % relative Luftfeuchtigkeit) 70 % seines Gewichtes an Wasser adsorbieren. Vermischt man DMSO mit Wasser, was in jedem Verhältnis möglich ist, so tritt eine starke Erwärmung (Verdünnungsenthalpie) auf. Ferner erhält das vorher geruchlose Dimethylsulfoxyd beim Vermischen mit H_2O einen

stechenden, knoblauchartigen Geruch. Die Strukturformel des Dimethyl-Sulfoxyds ist $CH_3 - \underset{\underset{O}{\|}}{S} - CH_3$

3. Physikalische Konstanten des DMSO (nach SCHEFFLER, 31)

1. Molekulargewicht	78,13
2. Siedepunkt / 760 mmHG	189° C
3. Schmelzpunkt	18,45° C
4. Dichte bei 20° C	1,100-1,102 g/ccm
5. Dampfdruck bei 20° C	0,37 Torr
6. Dielektrizitätskonstante bei 20° C	48,9
7. Viskosität bei 25° C	1,98 cP
8. Brechungsindex nD^{20}	1,4790
9. Leitfähigkeit	$3x10^{-8}$ Ohm^{-1} cm^{-1}
10. Flammpunkt (offene Schale)	95° C
11. Schmelzwärme bei 18,4° C	20 cal/g
12. Verbrennungswärme bei 25° C	6050 cal/g
13. Lösungswärme bei 20° C	60 cal/g

C) Pharmakologische Eigenschaften von DMSO

1. Permeabilitätserhöhung

1965 bestätigte JACOB (14) die permeabilitätserhöhende Wirkung des DMSO an Membranen, besonders an der Haut von Mensch und Tier. Dort verstärkt DMSO das Penetrationsvermögen bestimmter Stoffe (Jod, Cortison, Penicillin u.a.) wesentlich. Ferner wirkt es als Resorptionsvermittler, der in seiner Vehikeleigenschaft von keinem anderen bis heute bekannten Stoff übertroffen wird.

FABIANEK und HERP (4) fanden 1966, daß DMSO bei Albinoratten nach intradermaler Injektion von 0,2 % DMSO (mit Evans Blau in Kochsalzlösung als Indikator) keine Permeabilitätserhöhung bewirkt, sondern im Gegenteil eine leichte Hemmung der Penetration (ca. 60 %) hervorruft. Sie konnten eine permeabilitätserhöhende Wirkung des DMSO erst in der "unphysiologischen" Kon-

zentration von 50 % feststellen. Die Penetrationserhöhung bei dieser DMSO-Konzentration ist aber nach Meinung der Autoren offensichtlich (da eine entzündliche Reaktion sichtbar war) auf eine Schädigung des Gewebes zurückzuführen, obwohl die Autoren andererseits einräumen, daß es nach in-vitro-Versuchen unwahrscheinlich ist, daß die Hautschranke angegriffen wurde (BARKER et al., 1).

Hierzu liegen Ergebnisse von KLIGMAN (20) vor, der Biopsien von menschlicher Haut 24 Stunden nach intradermaler Injektion von 50%igem DMSO entnahm und untersuchte. Die Schnitte zeigten Oedeme, starke lymphozytäre Infiltration mit eosinophilen Granulozyten und polymorphkernigen Leukozyten, Vasodilatation und geringfügige Veränderungen im Bereich der Epidermis.

FABIANEK und HERP (4) stellten ferner fest, daß DMSO, wenn es zusammen mit einem die Permeabilität der Haut hemmenden Stoff verabreicht wird (z.B. Natrium-Diäthyldithiocarbamat in 2%iger Konzentration), die hemmende Wirkung dieses Stoffes verstärkt.

NARULA (25) wies nach, daß der Farbstoff Rhodamin B, in DMSO gelöst, die Haut kleiner, lebender Fische in stärkerem Maße und nachhaltiger durchdrang, als wenn der Farbstoff in Alkohol oder in Seewasser gelöst worden war. Auch bei Versuchen mit anderen Farbstoffen und anderen Lebewesen konnte NARULA (25) die hervorragende Eigenschaft des DMSO als Penetrationsvermittler an lebenden Membranen nachweisen, wobei DMSO dem Äthylalkohol überlegen war.

2. Potenzierende Wirkung

Eine potenzierende Wirkung des DMSO für manche Medikamente konnte 1966 von JACOB und ROSENBAUM (17) bestätigt werden. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß die Gesamtdosis eines Medikamentes, wenn es in DMSO gelöst verabreicht wird, kleiner sein kann als diejenige Dosis,

welche ohne DMSO verabreicht, den gleichen therapeutischen Effekt erzielen, womöglich aber unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen würde. Diese Tatsache ist besonders beim Einsatz relativ toxischer Stoffe von Bedeutung. Die Wirkungspotenzierung des DMSO machte schon JACOB (14) anhand des Insulins deutlich: gibt man Hunden gemeinsam Insulin und DMSO intravenös, so kommt es zu einer verstärkten Blutzuckersenkung.

3. Analgetische Wirkung

Eine analgetische Wirkung von DMSO konnte bei Mensch und Tier im Versuch festgestellt werden. Sie beruht nach JACOB (14) auf einem osmotischen Effekt. Bringt man z.B. 25%iges DMSO auf den isolierten Nervus saphenus der Katze, so erreicht man eine komplette Blockierung der Erregungsleitung. Wäscht man das DMSO wieder ab, so kehrt die Erregungsleitung zurück. Die beim Menschen beobachtete Schmerzverminderung bei Entzündungen ist nach Meinung des Autors möglicherweise darauf zurückzuführen, daß es im Entzündungsgebiet zu einer DMSO-Anreicherung und damit zu einer Blockierung der afferenten Nervenfasern kommt. DMSO wirkt jedoch nicht als Anästheticum, da die Sensibilität für Hitze oder Nadelstich im normalen Gewebe erhalten bleibt (JACOB und ROSENBAUM, 17). Die Schmerzlinderung bzw. -ausschaltung setzt beim Menschen ca. 30-40 Minuten, oft auch früher, nach lokaler Applikation von DMSO ein und hält gewöhnlich 4 - 6 Stunden an (17). Der wiederkehrende Schmerz ist dann meist geringer als anfänglich. Dies bestätigen auch Untersuchungen von HILD (13), MATHIES (24), NEUMEYER (26), LÜTH (23) und LEAKE (21) durch die klinische Erprobung am Menschen.

4. Antiphlogistische Wirkung

Die antiphlogistische Wirkung des DMSO ist meist verbunden mit einer abschwellenden Komponente, wie dies durch JACOB (14) im Tierexperiment nachgewiesen wurde. An Ratten wurden schwere Quetschverletzungen des Coecums gesetzt, wobei bei den mit einer 15%igen DMSO-Lösung behandelten Tieren die Adhäsionen nach 10 Tagen wesentlich geringer waren als bei den unbehandelten. Entzündungshemmung war im Tierversuch an Cortison-empfindlichen Testgranulomen festzustellen (14). Ferner konnte ein sofortiger Rückgang der Oedembildung als Folge von Hautentzündungen bei Meerschweinchen beobachtet werden (JACOB, BISCHEL und HERSCHLER, 15).

KLIGMAN (20) setzte auf dem Rücken von 5 Versuchspersonen Verbrennungen zweiten Grades und behandelte einen Teil der Brandwunden sofort mit 95%igem DMSO, den anderen Teil mit Wasser. Die mit DMSO behandelten Hautstellen wurden unter einem leichten, luftdurchlässigen Gaze-Verband gehalten. Die Behandlung mit DMSO erfolgte dreimal täglich 10 Tage lang, aber der Autor konnte keine wesentliche Beeinflussung der Heilung von Brandwunden durch DMSO feststellen.

JACOB, BISCHEL und HERSCHLER (15) dagegen beobachteten, daß DMSO die Blasenbildung bei Verbrennungen zweiten Grades am Menschen vermindert und daß bei Verbrennungen dritten Grades, die an Versuchstieren gesetzt wurden, der Brandschorf durch DMSO-Behandlung lange Zeit ohne Infektion als natürliche Wundbedeckung erhalten blieb.

In der Praxis konnte eine entzündungshemmende Wirkung bei Erkrankungen des Muskel-Skelett-Systems des Menschen, verbunden mit einer Rückbildung von Oedemen und einem Nachlassen der Schmerzen, festgestellt werden, wobei akute Entzündungen weitaus besser zu beeinflussen waren als chronische (STEINBERG, 33).

5. Bakteriostatische Wirkung

Die bakteriostatische Wirkung von DMSO konnte bisher nur in vitro nachgewiesen werden, wo es in einer 20-40%igen Konzentration das Wachstum zahlreicher Mikroorganismen hemmt; für einige von ihnen war DMSO sogar bakterizid (JACOB und ROSENBAUM, 17).

JACOB, BISCHEL und HERSCHLER (15) fanden schon 1964, daß eine 20%ige DMSO-Lösung bakteriostatisch wirkt gegen E. coli, Staph. aureus und Pseudomonas, und in 10%iger Konzentration gegen Mycobacterium tuberculosis. Offensichtlich verändert DMSO die Empfindlichkeit antibiotica-resistenter Bakterienstämme. Von JACOB (14) wurden 1965 Versuche zur Viruzidie des DMSO gemacht, wobei das Poliovirus Typ 2 verus verwendet wurde. Eine sichere viruzide Wirkung konnte nicht beobachtet werden, jedoch trat ein gewisser virustatischer Effekt auf bei DMSO-Konzentrationen von etwa 95%, wahrscheinlich durch Proteolyse.

6. Fungistatische Wirkung

Eine fungistatische Wirkung konnte in 10%iger Konzentration auf zahlreiche Pilze nachgewiesen werden (JACOB, 14). KITZMILLER (19) machte ebenfalls Versuche über eine eventuelle fungistatische bzw. fungizide Wirkung von DMSO, stellte aber fest, daß DMSO, bis zu 1% in Agar gelöst, keine Wirkung hat auf Microsporon audouini, M. gypseum, M. canis, Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes, Candida albicans, C. neoformans, Histoplasma capsulatum, Bacterium dermatidis und Sporotrichon schenckii. KLIGMAN (20) dagegen erwähnte fungizide Wirkungen bei 60-70%igen DMSO-Konzentrationen.

7. Sedative Wirkung

Eine sedative Wirkung des DMSO wurde von JACOB (14) zuerst an Ratten und später auch bei Patienten nach DMSO Behandlung beobachtet.

Interessante Ergebnisse hierzu schildern RAMIREZ und LUZA (27). Sie verabreichten an Patienten, die unter schweren Psychosen (manisch-depressives Irresein, Alkohol-Psychosen) und Schizophrenie litten, 2-5 mal täglich 5 ml einer 50-80%igen DMSO-Lösung intramuskulär und erzielten damit erstaunliche Therapieerfolge. Die Injektionen wurden von allen Patienten gut vertragen. Dabei zeigte sich nicht nur eine sedative, sondern vor allem eine antipsychotische Wirkung des DMSO.

Dieselbe Wirkung stellte auch LEAKE (21) fest, hauptsächlich bei Patienten mit psychomotorischer Agitation und Ängstlichkeit. Er führte diese Wirkung darauf zurück, daß DMSO offenbar in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren.

8. Diurese-Effekt

Ein diuretischer Effekt bei DMSO-Anwendung wurde 1964 bereits von JACOB, BISCHEL und HERSCHLER (15) festgestellt. Nach intravenösen Gaben von DMSO konnte bei Hunden die Urinmenge verdoppelt werden, aber auch bei kutaner Verabreichung trat eine Erhöhung des Urinvolumens auf. FORMANEK und SUCKERT (5) stellten durch Versuche mit weiblichen Albino-Ratten bei wiederholter kutaner Applikation von DMSO eine bis zum zehnfachen des Normalen erhöhte Urinausscheidung fest.

D) Wirkungen von DMSO an der Haut des Menschen

1. Der Mechanismus der Permeabilitätsveränderung

Der Mechanismus der Permeabilitätsveränderung an der Haut durch DMSO ist noch nicht restlos geklärt. KLIGMAN (20) untersuchte 1965 diese Wirkung genauer. Er zeigte, daß Tetrachlorsalicylanilid, ein Farbstoff, von 60%igem DMSO in wenigen Minuten und von 90%igem DMSO in einer Minute durch die Hornschicht der Haut geschleust wird, während dies bei anderen Lösungsmitteln nicht oder nur sehr viel langsamer gelang. Dasselbe geschah mit Dimethylchlortetracyclin-Hydrochlorid

(Declomycin), einem fluoreszierenden Antibioticum. Auch hierbei erwiesen sich hohe DMSO-Konzentrationen (50-90%) am wirksamsten. (Bei 90%igem DMSO dauerte die vollständige Penetration des Antibioticums durch die Hornschicht der Haut 20 Minuten, bei 70% 55 Minuten und bei 50% 120 Minuten.)

Um die Wirkungsweise des DMSO weiter zu beleuchten, unternahm derselbe Autor (20) noch folgenden Versuch: ein kleiner Baumwoll-Lappen wurde mit 0,1% wässriger Methylenblau-Lösung getränkt, auf die Haut der Versuchsperson aufgebracht und unter einem Okklusiv-Verband gehalten. Nach 2 Tagen wurde der Verband entfernt; die Farblösung war nur oberflächlich durch die Hornschicht der Haut penetriert. Der Farbfleck konnte mit 5-6 Cellophan-Klebestreifen, an denen die einzelnen Hornschichten hängenblieben, vollständig entfernt werden. Derselbe Versuch wurde dann mit einem mit DMSO getränkten Baumwoll-Lappen wiederholt. Die DMSO-Konzentrationen lagen zwischen 90% und 100%. Der Okklusiv-Verband blieb 15 Minuten bis 1 Std. auf der Haut. Sofort nach Entfernen der Baumwoll-Läppchen wurde ein mit Methylenblau getränkter Lappen auf dieselben Hautstellen aufgebracht. Bereits nach 15 Minuten war die Färbung des Stratum corneum so weit fortgeschritten wie bei dem Versuch ohne DMSO-Vorbehandlung, und nach 1 Stunde war das ganze Stratum corneum von dem Farbstoff durchdrungen. Auch wenn die mit DMSO vorbehandelte Haut vor Auflegen des Methylenblau-Läppchens gründlich mit Seife und Wasser oder gar mit Äther oder Alkohol abgewaschen wurde, so änderte dies nichts an der schnellen und vollständigen Penetration des Farbstoffes.

Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß DMSO eine grundlegende Änderung der Diffusionsbereitschaft der Hornschicht der menschlichen Haut bewirkt, so daß eine irreversible Penetrationserhöhung erreicht wird. Diese Folgerung erwies sich jedoch während weiterer Versuche als falsch. Es ergab sich, daß nach 1 1/2 Stunden die vollständige Penetration des Farbstoffes durch das Stratum corneum

beendet war und von da an abnahm - nach 2 Stunden konnte der Farbfleck bereits mit 6-10 Klebestreifen entfernt werden, was bedeutete, daß nur noch die Hälfte bis ein Drittel der Hornschicht gefärbt war. Nach 3 Stunden und mehr konnte keine Penetration mehr festgestellt werden.

KLIGMAN (20) kam aufgrund dieser Tatsache zu dem Ergebnis, daß DMSO nicht, wie ursprünglich vermutet, eine irreversible Permeabilitätsveränderung im Stratum corneum bewirkt, denn eine so schwere Schädigung des Zellverbandes, wie sie dafür erforderlich gewesen wäre, könnte in einem toten Gewebe, wie es die Hornschicht darstellt, nicht innerhalb weniger Stunden wieder hergestellt sein. Versuche haben ergeben, daß DMSO die Haut mit großer Geschwindigkeit durchdringt, und die Menge DMSO, die die Haut durchdringt, ist vermutlich ebenfalls sehr hoch, wahrscheinlich 50% oder mehr, obwohl hierüber noch keine exakten Angaben vorliegen. Jedenfalls läßt das völlige Aufhören der Penetration nach 3 Stunden vermuten, daß der größte Teil des DMSO, wenn nicht die ganze Menge, die Haut passiert hatte. Die potenzierende Wirkung ist also nur solange vorhanden, als eine bestimmte "kritische" Menge DMSO innerhalb der Hornschicht vorzufinden ist. Es scheint, daß DMSO "Pfade" schafft für die Diffusion vieler Stoffe, die dann wie auf "Kanälen" das Gewebe passieren.

Im Gegensatz zu anderen Stoffen, z.B. Alkalien oder Detergentien, die ebenfalls eine Penetrationserhöhung der Haut bewirken, dabei aber die Hornschicht schwer schädigen, verursacht DMSO keine oder zumindest nur sehr geringfügige Veränderungen der Struktur des Stratum corneum, so daß eine langdauernde Therapie möglich ist. KLIGMAN (20) wies in Versuchen nach, daß DMSO anscheinend die Hornschicht der Haut etwas verhärtet; sie wird brüchig und verliert an Elastizität.

GOTTLOB (9) konnte nachweisen, daß DMSO die Gefäßendothelien ganz ohne Schädigung derselben passiert.

2. Penetrationstiefe und Penetrationsweg

Um die Penetrationstiefe und den Weg zu ermitteln, auf welchem DMSO die menschliche Haut durchdringt, unternahmen SULZBERGER, CORTESE et al. (35) weitere Versuche. Sie trugen 1 Tropfen einer Indikatorlösung (1% Methylenblau bzw. 1% Jodlösung) zusammen mit 1 Tropfen 90%igem DMSO auf beliebige Hautstellen der Versuchspersonen auf. Auf eine entsprechende andere Hautstelle kam 1 Tropfen Indikator mit Wasser. Die Tropfen wurden gut vermischt und in die Haut eingerieben. Nach 20 - 45 Minuten wurden sie mit einem Mull-Lappen abgewischt. Unter Lokalanästhesie mit 1% Xylocain wurden anschließend Hautbiopsien entnommen. Die Proben wurden von außen nach innen entnommen, wobei eine weitere Verteilung der Farbstoffe in die Tiefe sorgfältig vermieden wurde. Nun wurden Gefrierschnitte angefertigt, ohne weitere Färbung der Präparate. Keiner der beiden Farbstoffe war über das Stratum corneum hinaus nachzuweisen.

Derselbe Versuch wurde wiederholt: an einer Hautstelle wurde 1% Methylenblau mit 90%igem DMSO aufgetragen, an einer anderen Stelle 1% Methylenblau mit Wasser. Nach 20-45 Minuten wurden beide Stellen sorgfältig mit 70%-igem Alkohol abgerieben. Danach war an der Stelle des Methylenblau mit Wasser kein Farbfleck mehr zu sehen, während an der anderen Stelle deutliche Farbdepots rund um die Haarbälge zu sehen waren.

Um die Penetration von Farbstoffen an mit DMSO vorbehandelter Haut untersuchen zu können, wurden mit 90%igem DMSO getränkte Baumwoll-Läppchen unter Okklusiv-Verband durch einen Plastikfilm auf die Rückenhaut von Versuchspersonen aufgebracht. Als Kontrollversuch wurde ein Lappen mit 0,1% wässriger Methylenblau-Lösung auf dieselbe Weise aufgebracht. Nach 1 Stunde wurden die Läppchen entfernt. Auf die mit DMSO getränkten Hautstellen wurden nun wiederum Läppchen unter Okklusiv-Verband durch Plastikfilm gelegt, diesmal mit 1% wässriger Methylen-

blau-Lösung getränkt. Sie wurden 5 Minuten bis 2 Stunden auf der Haut belassen. Nach Entfernen der Läppchen wurde die Haut vorsichtig mit Gaze abgewischt. Mit Klebestreifen wurde nun die Haut Schicht für Schicht abgezogen, um die Eindringtiefe des Farbstoffes festzustellen. Nach 30 Minuten Einwirkungszeit waren 13 Klebestreifen notwendig, um den Farbfleck vollständig von der Haut zu entfernen. Entlang der Haarbälge jedoch war der Farbstoff tiefer eingedrungen und als kleine, blaue Pünktchen sichtbar. Um das Stratum lucidum zu erreichen, waren weitere 9 Klebestreifen erforderlich. Nach einer Einwirkungszeit von 2 Stunden war mit dem vollständigen Entfernen des Farbfleckes gleichzeitig das Stratum lucidum erreicht. Die Zahl der zur Fleckentfernung nötigen Klebestreifen nahm also zu, je länger die Einwirkungszeit des Farbstoffes gewesen war. Entlang der Haarbälge wiederum war der Farbstoff tiefer eingedrungen, so daß diese nach Entfernung des Farbfleckes wieder als kleine, blaue Pünktchen sichtbar blieben.

An der Kontrollstelle, an welcher Methylenblau ohne DMSO-Vorbehandlung 3-24 Stunden unter Okklusiv-Verband eingewirkt hatte, waren nur ca. 5-7 Klebestreifen nötig, um den Farbfleck völlig zu entfernen.

Ein Gefrierschnitt einer mit DMSO vorbehandelten Hautstelle, die nicht durch Klebestreifen abgetragen worden war, zeigte, daß das Stratum corneum vollständig mit dem Farbstoff angefärbt war, daß aber bis auf einen Fall kein Farbstoff in den darunterliegenden Schichten der Epidermis zu sehen war. Ein Teil der Versuchspersonen zeigte eine leichte Färbung des Stratum germinativum, aber diese Tatsache könnte auch auf Fehler bei der Zubereitung der Schnitte zurückzuführen sein.

Die Versuche ergaben, daß Farbstoffe, die in DMSO "eingehüllt" sind, die Hornschicht der Haut sehr schnell durchdringen und sich darin ablagern. Die Autoren konnten jedoch keinen Farbstoff in den darunterliegenden

Schichten der Haut finden. Dafür könnte es, nach Meinung der Autoren, folgende Gründe geben:

1. daß kein Farbstoff in die unter dem Stratum corneum liegenden Hautschichten penetriert,
2. daß der Farbstoff, falls er in tiefere Schichten penetriert war, zu sehr verdünnt war, so daß er in den dünnen Schnitten unter dem Lichtmikroskop nicht mehr sichtbar wurde,
3. daß eventuell in tiefere Schichten eingedrungener Farbstoff bereits weiterbefördert oder von anderen Stoffen überlagert oder inaktiviert worden war, bevor die Biopsie gemacht wurde,
4. daß der Farbstoff-Indikator auf irgendeine Weise durch das histologische Verfahren zerstört oder ausgeschwemmt worden war.

Diese Ergebnisse verstärken die Vermutung, daß die penetrationserhöhende Wirkung von DMSO für bestimmte Stoffe zu einem großen Teil entlang der Haarbälge, wahrscheinlich über die in die Haarbälge übergehende Hornschicht, vonstatten geht.

3. DMSO als "Carrier" in Abhängigkeit von den einzuschleusenden Stoffen

a) Molekülgröße

JACOB und ROSENBAUM (17) kamen aufgrund ihrer Erfahrungen mit DMSO als "Carrier" zu der Feststellung, daß nicht ionisierte Moleküle von niedrigem Molekulargewicht die menschliche Haut am leichtesten durchdringen können, während hochmolekulare Verbindungen (z.B. Insulin, ionisierte Salze) die Haut auch mit DMSO als "Schlepper" kaum bzw. nur in geringem Maße durchdringen. Nicht alle Moleküle der zu transportierenden Substanz durchdringen die Haut; einige bleiben hinter der DMSO-Front zurück und werden im Stratum corneum oder anderen Gewebeschichten abgeladen. Die Adsorption ist jedoch auch individuell verschieden.

Die Abhängigkeit der penetrationserhöhenden Wirkung des

DMSO von der Molekülgröße der einzuschleusenden Stoffe wiesen SULZBERGER, CORTESE et al. (35) für einige die Nesselsucht hervorrufende Allergene nach. Sie hatten dazu 37 männliche Versuchspersonen zur Verfügung und konnten anhand der Prausnitz-Küster-Technik nachweisen, daß Stoffe mit einem hohen Molekulargewicht, z.B. Hausstaub, Tierhaare, verschiedene Gräser-, Getreide- und Pollenarten, mit DMSO kein Ansteigen der zu erwartenden Allergen-Reaktion zeigten im Gegensatz zur Kontrollseite. Bei Penicillin G dagegen war eine deutliche Verstärkung der Reaktion durch DMSO zu sehen.

Obwohl die Versuche nicht sehr zahlreich waren, kann doch angenommen werden, daß die penetrationserhöhende Wirkung des DMSO an der intakten menschlichen Haut für Allergene von deren Molekülgröße abhängig ist. So läßt sich auch erklären, daß z.B. Pollen von ragweed, einer wildwachsenden amerikanischen Kräuterpflanze, die Heuschnupfen und Asthma hervorruft, mit einem Molekulargewicht von über 38.000 auch mit DMSO nicht durch die Haut penetriert, während Penicillin G mit einem Molekulargewicht von 350 schon in Kochsalzlösung die Haut durchdringt und in DMSO eine deutliche Penetrationserhöhung zeigt.

Trotz der Abhängigkeit von der Molekülgröße liegt die Zukunft von DMSO hauptsächlich in seiner Carrier-Eigenschaft, wobei aber jeweils abzuklären ist, ob und inwieweit DMSO mit den einzuschleusenden Stoffen reagiert.

b) Komplexbildung

Hierzu liegen einige Ergebnisse von KLIGMAN (20) vor, die zeigen, daß DMSO zum Teil mit den einzuschleusenden Stoffen Komplexe bildet.

Fügt man einer Lösung, die 1% Alt-Tuberkulin enthält, 50%ige DMSO-Lösung hinzu, so verschwinden positive Tuberkulin-Reaktionen bei den Versuchspersonen. Durch

subkutane Gaben einer 1%igen Trypsin-Lösung ist es möglich, eine Dermatitis beim Menschen auszulösen. Fügt man der Trypsin-Lösung aber 50%iges DMSO hinzu, so bleibt die Dermatitis aus. Eine wahrscheinliche Erklärung für diese Erscheinungen ist, daß DMSO Komplexe mit Proteinen bildet und diese dabei denaturiert werden.

Bei Versuchspersonen, die allergisch waren gegen bestimmte Metallverbindungen, z.B. Nickel- oder Chromverbindungen, blieben die allergischen Reaktionen aus, wenn den Metallsalz-Lösungen DMSO beigefügt wurde. Dies scheint die Feststellung von JACOB, BISCHEL und HERSCHLER (16) zu bestätigen, daß DMSO mit Metallsalzen Komplexe bildet. Die beschriebenen Erscheinungen traten allerdings erst auf bei DMSO-Konzentrationen über 25%.

Im Gegensatz zu den bisher gemachten Erfahrungen der penetrationserhöhenden Wirkung von DMSO steht die Tatsache, daß bei manchen Stoffen die Penetration durch DMSO sogar gehindert wird durch Komplexbildung mit der einzuschleusenden Substanz. Eine mögliche Inaktivierung des zu penetrierenden Stoffes muß also immerhin in Betracht gezogen werden.

4. Toxizität und Nebenwirkungen

Bisher erwies sich DMSO als relativ untoxisch für den Organismus, abgesehen von der andernorts diskutierten Refraktionsänderung der Linse bei Versuchstieren im Langzeitversuch (RUBIN und BARNETT, 29). Was die Nebenwirkungen bei örtlicher Applikation betrifft, so handelt es sich hierbei hauptsächlich um eine lokale Hautreizung, abhängig von der angewandten DMSO-Konzentration, vom Hauttyp und von der behandelten Körperregion. Zu erwähnen wäre hierzu noch der typische, knoblauch- bzw. austernartige Mundgeruch, der sich stets bei der Anwendung von DMSO einstellt. Er stammt von einem Abbauprodukt des DMSO, dem Dimethylsulfid.

JACOB (14) macht für die Hautreaktionen die Freisetzung von Histamin aus den Mastzellen verantwortlich, während GÜNZEL und RICHTER (10) die Reizerscheinungen auf die starke hygroskopische Eigenschaft des DMSO zurückführen. Sie nehmen an, daß unter Ablauf einer exothermen Reaktion dem umliegenden Gewebe Wasser entzogen und es dadurch vorübergehend geschädigt wird. Damit wäre auch die Abnahme der Reizerscheinungen bei stärkerer Verdünnung des DMSO zu erklären. Im Tierversuch konnten die genannten Autoren (10) an Hunden nach einer 16 Wochen dauernden, oralen Verabreichung von 50-75%igen DMSO-Lösungen keinerlei Schädigungen feststellen außer einer leichten Schrumpfung der Epithel- und Drüsenzellen der Magenschleimhaut. Nach Auftragen der reinen Substanz auf die Haut von Ratten (SOMMER und TAUBERGER, 32) und Kaninchen (BROWN et al., 2) wurden keinerlei Reizerscheinungen beobachtet. Meerschweinchen ließen sich durch wiederholte intradermale Injektionen nicht sensibilisieren. KLIGMAN (20) wies in Versuchen an 25 Personen durch wiederholte kutane Gaben von 90%igem DMSO nach, daß dieser Stoff keine sensibilisierende Wirkung auf die menschliche Haut hat.

KITZMILLER (19) fand, wie auch EPSTEIN (8) und KLIGMAN (20), daß die wiederholte lokale Applikation von DMSO gelegentlich ein Härterwerden der Haut verursachen kann.

Über eventuell auftretende Toxizitätserscheinungen bei der Behandlung großer Hautflächen oder gar bei der Ganzkörperbehandlung über längere Zeiträume, wie dies z.B. bei ausgedehnten Dermatosen der Fall wäre, liegen bisher nur einige Angaben vor.

GOLDMAN, IGELMAN und KITZMILLER (7) behandelten 90% der Körperoberfläche von Patienten mit DMSO-Lösung. Die Untersuchungen auf irgendwelche Toxizitätserscheinungen waren negativ.

KLIGMAN (20) unternahm einen Langzeitversuch mit 20 Versuchspersonen, die einmal täglich den ganzen Körper, vom Kinn bis zum Becken, mit 90%igem DMSO einrieben. Vor Versuchsbeginn und in Abständen von 2, 4, 6, 8, 12, 16 und 24 Wochen wurden folgende Laboruntersuchungen vorgenommen: Blutbild, Urinuntersuchung, Thymoltrübungstest, SGOT, Blutzuckergehalt und Blutharnstoffbestimmung.

Eine sedative Wirkung konnte bei laufender Befragung der Versuchspersonen in keinem Fall festgestellt werden. Fast alle an dem Versuch Beteiligten klagten über den faden, austernähnlichen Mundgeruch. Die Laborwerte blieben im allgemeinen während der Zeit des Versuches normal. Ein Teil der Versuchspersonen beobachtete ein vorübergehendes Erythem während der ersten beiden Wochen der Applikation. Bei 2 Personen entwickelte sich eine leichte, schuppende Dermatitis nach 2-3 Wochen, die aber trotz fortgesetzter Behandlung wieder verschwand. Ein vorübergehendes Brennen, Jucken oder Stechen trat in fast allen Fällen auf. Histologische Untersuchungen von Biopsien aus der Rückenhaut ergaben keine Veränderungen.

Derselbe Versuch wurde noch einmal mit 20 anderen Versuchspersonen gemacht. Diesmal wurde 90%iges DMSO zweimal täglich, aber nur 3 Wochen lang, angewandt. Auch diesmal blieben die Laborwerte im Bereich des Normalen. Allerdings traten bei 2 Personen während des Versuches toxische Reaktionen auf, und zwar einmal in Form eines diffusen Erythems, schuppenden Hautausschlages und schweren Bauchkrämpfen. Im anderen Fall wurde über leichtes Schwindelgefühl, Schüttelfrost und Schmerzen im Bereich der Brusthöhle geklagt. In beiden Fällen verschwanden die Symptome nach dem Absetzen von DMSO.

Ein Erythem bildete sich in fast allen Fällen während der ersten 30 Minuten nach der Anwendung aus und war teilweise mit Bläschenbildung verbunden. Die Reaktionen dauerten ca. 20 Minuten bis höchstens 1 Stunde an und

sind als eine Folge der Histaminfreisetzung anzusehen. Die von KLIGMAN besprochene Erschöpfung der Histaminvorräte der Mastzellen wurde bestätigt durch das Verschwinden der Symptome bei fortgesetzter Anwendung von DMSO. Die histologische Untersuchung der Haut ergab eine leichte Schädigung der Epidermis: mäßige Acanthosis und Parakeratosis, Verschwinden des Stratum granulosum und eine leichte perivaskuläre Lymphozyten-Infiltration. Diese Veränderungen waren auch bei Personen zu sehen, die keine entzündlichen Reaktionen auf ihrer Haut beobachtet hatten.

In Versuchen mit lokaler DMSO-Applikation unter Okklusiv-Verband zeigte KLIGMAN (20) einmal im 24-Stunden-Versuch und einmal im Kurzzeitversuch, daß DMSO die Haut unter Luftabschluß mehr reizt und, wie im histologischen Präparat sichtbar wurde, auch mehr schädigt. Im Kurzzeitversuch entstanden nach 1 Stunde durch 90%iges DMSO zahlreiche kleine, durchsichtige Bläschen auf der Haut. Sie verschwanden nach einigen Stunden, und es entstand an der Stelle eine leichte, schuppende Dermatitis. Die Bläschenbildung blieb jedoch aus, wenn DMSO in einer Konzentration von 80% verwendet wurde. Im histologischen Präparat fiel auf, daß es sich nur schwach anfärbte, daß die Zellgrenzen des Stratum germinativum verschwommen waren und daß das Stratum granulosum fast verschwunden war. Die Zellen erschienen wie angeschwollen, die Zellkerne waren geschrumpft. Teilweise sah es so aus, als ob die Zellen geplatzt wären und kleine Bläschen bildeten. Die Zellmembran hatte also offensichtlich ihre Permeabilität verloren, und das außergewöhnliche "Anschwellen" der Zellen war wohl auf den Ersatz des Zytoplasmas durch das hygroskopische DMSO zurückzuführen.

Die Behandlung der menschlichen Haut unter Okklusiv-Verband führt also offensichtlich durch Dehydrierung und Verlust der selektiven Permeabilität zum Zelltod. Der Autor wies diese Erscheinungen auch für DMSO-Konzentrationen von 30% nach, obwohl hierbei rein äußerlich keine Veränderungen oder Reaktionen der Haut fest-

zustellen waren. Bei fortdauernder Behandlung der Haut mit DMSO unter Okklusiv-Verband kam es innerhalb eines Monats zu einer beträchtlichen Verhärtung der Haut.

Zu ähnlichen Ergebnissen wie KLIGMAN kamen auch SULZBERGER, CORTESE et al. (35), allerdings ohne mit Okklusiv-Verband zu arbeiten. Sie behandelten 29 männliche Versuchspersonen auf der Rückenhaut mit DMSO in Konzentrationen von 20% bis 100%. Jeweils 1 Tropfen wurde sorgfältig verrieben und 40-60 Minuten auf der Haut belassen. In sehr vielen Fällen entstanden bei 90%igem DMSO innerhalb von 5-15 Minuten viele kleine Bläschen um die Haarbälge herum, die mit einem roten Ring umgeben waren. Nach 20-30 Minuten flossen sie dann zusammen und bildeten eine Quaddel, die ca. 1 Stunde lang zu sehen war. Nahezu alle Versuchspersonen reagierten bei DMSO-Konzentrationen über 70% mit Quaddelbildung und Erythem, manche jedoch auch bei niedrigeren Konzentrationen. Bei einigen Versuchspersonen zeigte sich nicht einmal mit 90%igem DMSO eine Reaktion, während sie bei anderen mit niedrigen Konzentrationen größer war als mit hohen.

Im histologischen Präparat sahen die Autoren ähnliche Veränderungen der Epidermis, wie sie KLIGMAN nach DMSO-Behandlung der Haut unter Okklusiv-Verband beschrieben hatte. Diese Veränderungen könnten nach Meinung der Autoren (35) darauf zurückzuführen sein, daß das DMSO bestimmte Stoffe aus der Hornschicht "herausgewaschen" hat. Die Haut fühlte sich auch an, als ob sie lange ins Wasser getaucht worden wäre oder als ob sie unter einem luftdichten Verband gelegen hätte. Es könnte also sein, daß eine örtliche Anwendung von DMSO doch eine Veränderung der Hornschicht der Haut bewirkt, die auf Extraktion und Dehydrierung zurückzuführen ist, so daß diese Schicht ihre Fähigkeit, als Schranke zu wirken, bis zu einem gewissen Grade einbüßt. Dies könnte eine andere Erklärung für die penetrationserhöhende Wirkung von DMSO sein.

5. Wirkung von DMSO an der Euterhaut
und im Euter von Kühen und Schafen

WALSER (37) und KIRSCHMER (18) stellten anhand von Versuchen mit Penicillin fest, daß DMSO an der Euterhaut laktierender Kühe ebenfalls penetrationsfördernd wirkt gegenüber der Applikation von Penicillin in Aqua dest. Während der Versuchsdauer konnten keine Nebenwirkungen an den Tieren festgestellt werden, lediglich in einigen Fällen eine leichte Hautrötung am Euter und an den Zitzen, die aber nach etlichen Stunden wieder verschwand, und eine geringfügige Geschmacksabweichung der kurz nach der Applikation entnommenen Milchproben.

WALSER (37) konnte nach kutaner Applikation von Penicillin mit DMSO auf die Euterhaut einen Penicillinspiegel auch im Blutserum der Kühe feststellen, der allerdings weit unter dem in der Milch gemessenen lag.

An Schlachtkühen unternahm der Autor folgenden Versuch: 1 1/2 Stunden vor der Schlachtung wurden einer Kuh 6 Mio. I.E. Penicillin-G-Natrium in 20 ml DMSO 90% auf die Euterhaut aufgetragen. Bei der Schlachtung wurde Blut aufgefangen und das Euter mit Zitzen und Euterhaut vollständig abgetrennt. 3 Stunden nach der Penicillin-Applikation wurden aus den inneren Teilen des Euters, die nicht mit der äußeren Haut in Berührung gekommen waren, Gewebsproben entnommen, und zwar aus verschiedenen Partien des Drüsenparenchyms, aus dem Kapselfett und aus dem supramammären Lymphknoten. Die aus den Schnittflächen austretende Milch wurde aufgefangen. Die Gewebsproben wurden homogenisiert und mit Hilfe des Agardiffusionsverfahrens auf ihren Gehalt an Penicillin untersucht.

Mit Ausnahme einer Probe ließ sich in allen Gewebsproben aus dem Drüsenparenchym Penicillin nachweisen, wobei hautnah gelegene Proben die höchsten Konzentrationen ergaben. Hohe Werte zeigten auch die Proben aus dem Lymphknoten. Milch und Blutserum ergaben positive Werte, während im Fettgewebe kein Penicillin nachzuweisen war.

Um eine mögliche Eigenhemmung des Eutergewebes auszuschalten, wurde das Material 30 Minuten lang auf 65°C erwärmt. Es zeigte sich jedoch keine Verminderung der Hemmwirkung gegenüber nicht erwärmtem Material.

KIRSCHMER (18) machte ebenfalls Untersuchungen an Schlachtkühen über die Eindringtiefe von DMSO-Penicillin-Lösungen nach kutaner Applikation. Er trug die Versuchslösung auf die rechte Euterhälfte auf und untersuchte Blut, Milch und Gewebsproben nach verschieden langer Einwirkungszeit. Dabei kam er zu ähnlichen Ergebnissen wie WALSER (37): in Blut und Milch ließen sich bereits nach kurzer Einwirkungszeit Penicillinspiegel nachweisen, und bei den Gewebsproben zeigten Proben aus dem hautnahen Gewebe und aus dem Euterlymphknoten die höchsten Werte. KIRSCHMER konnte eine geringe Diffusion des Penicillins in die unbehandelte linke Euterhälfte feststellen. 7 Stunden nach der Applikation waren nur noch im Euterlymphknoten Spuren von Penicillin festzustellen. Alle anderen Gewebeproben waren frei von Antibioticum. Da der Autor nachgewiesen hat, daß einerseits das Penicillin bereits 7 Stunden nach Applikation aus dem Eutergewebe eliminiert ist, andererseits aber nach einmaliger kutaner Anwendung einer DMSO-Penicillin-Lösung auf die Euterhaut tagelang und über mehrmaliges Ausmelken hinweg Penicillinspiegel gemessen werden konnten, muß dafür irgendwo ein Depot des Antibioticums angenommen werden. Dieses Depot liegt nach Meinung KIRSCHMERS vermutlich in der Euterhaut.

ZIV (38) befaßte sich mit der Frage, ob Farbstoffe, in DMSO gelöst und intramammär appliziert, von einem Euterviertel ins andere diffundieren. Dies war mit den bisher verwendeten Lösungsmitteln nicht möglich gewesen, da das dicke, faserreiche Ligamentum suspensorium mammae schwer zu durchdringen ist.

Er machte seine Versuche zunächst an gesunden Eutern laktierender Mutterschafe. Untersucht wurde die Diffusion von Acriflavin und Kristallviolett. Beide Farbstoffe

wurden einmal in steriler Kochsalzlösung gelöst, zum andern in 90%igem DMSO. Jeweils 7,5 ccm wurden in eine Euterhälfte eingebracht. Anschließend wurden von beiden Euterhälften in bestimmten Abständen Milchproben entnommen und diese kolorimetrisch auf ihren Gehalt an Farbstoffen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß, wenn der Farbstoff in Kochsalzlösung gelöst worden war, keine Diffusion in die andere unbehandelte Euterhälfte stattgefunden hatte, während der Farbstoff in DMSO gelöst bereits 2 Stunden nach der Infusion in der anderen Euterhälfte nachgewiesen werden konnte. Der Höhepunkt der Farbstoffdiffusion wurde 6-8 Stunden nach der Infusion erreicht. Nach 32-48 Stunden war der Farbstoff aus der unbehandelten Euterhälfte ausgeschieden.

Die Ausscheidung des Farbstoffes aus der mit DMSO behandelten Euterhälfte ging wesentlich langsamer vonstatten als aus der mit Kochsalzlösung behandelten Hälfte. Diese verzögerte Ausscheidung ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß DMSO den Farbstoff in tiefere Parenchymschichten transportiert, während der Farbstoff in Kochsalz gelöst sich hauptsächlich in den Hauptmilchgängen anreichert und von da schnell wieder ausgeschieden wird.

Als nächstes untersuchte ZIV (38), ob auch bei Verwendung von Antibiotica eine ähnliche Diffusion von einem Euterviertel ins andere festzustellen war. Hierzu standen 18 Schlachtkühe zur Verfügung, von denen keine während der letzten 3-4 Tage mit irgendeinem Antibioticum behandelt worden war. Viele der Kühe waren alt, mit palpierbaren, fibrösen Veränderungen am Euter. Teilweise waren die Kühe trockenstehend, und die laktierenden Kühe waren mindestens 3-4 Tage lang nicht mehr gemolken worden.

Für die Infusion war jeweils das rechte hintere Euterviertel vorgesehen. Milchproben, welche vor Versuchsbeginn aus diesen Vierteln entnommen worden waren, er-

gaben, daß nur 3 Kühe frei waren von euterpathogenen Keimen.

Ein Teil der Kühe erhielt eine intramammäre Infusion einer handelsüblichen, antibioticahaltigen Mastitis-Eutersalbe. Der andere Teil bekam dasselbe Antibioticum in derselben Menge wie der erste Teil verabreicht, doch wurde es hier in 90%igem DMSO gelöst und dann intramammär appliziert.

Anschließend wurden die Kühe nicht gemolken bis zu ihrer Schlachtung nach 48-72 Stunden. Dann wurden die Euter entfernt, und aus dem Euterparenchym aller vier Viertel wurden Proben entnommen. Diese Gewebsproben wurden in kleine Stücke geschnitten und mit Kochsalzlösung zu Suspensionen verarbeitet.

Diese Suspensionen wurden dann auf verschiedene Weisen auf ihren Antibiotica-Gehalt untersucht. Es wurden während des Versuches 9 verschiedene Antibiotica in verschieden großer Menge verwendet. Die Ergebnisse zeigten, daß die Antibiotica der handelsüblichen Mastitis-Eutersalben, bis auf einige Spuren, in den drei unbehandelten Euterviertel nicht nachweisbar waren, während bei den auf einem Viertel mit Antibioticum + DMSO behandelten Kühen in jedem Fall in den drei unbehandelten Vierteln das jeweilige Antibioticum nachzuweisen war, zum Teil in ziemlich hoher Konzentration. Die Antibiotica-Konzentration im Parenchym des behandelten Viertels war sehr viel höher, wenn 90%iges DMSO beigegeben worden war. Nur einige fibrös veränderte und atrophierte, unbehandelte Euterviertel zeigten auch bei Verwendung von DMSO keine Diffusion des Antibioticums. Die höchsten Werte (bei Verwendung von DMSO) wiesen diejenigen Viertel auf, die bei der Palpation keine Veränderungen des Gewebes ergeben hatten.

Die niedrigsten Antibiotica-Konzentrationen bei den mit DMSO behandelten Kühen zeigte stets das linke vordere Viertel, da es durch seine diagonale Lage zum behandelten, rechten hinteren Viertel mit diesem die ge-

ringste Kontaktfläche hatte und deshalb das Antbioticum wahrscheinlich erst auf dem Wege über die beiden anderen Viertel (links hinten und rechts vorne) dorthin gelangen konnte.

Diese Ergebnisse zeigten, daß DMSO in der Lage ist, das dicke fibröse Bindegewebe des Ligamentum suspensorium mammae zu durchdringen und sogar noch andere Stoffe mitzuschleusen. Der Autor sieht darin im Hinblick auf die Mastitis-Behandlung gute Möglichkeiten für die intramammäre Applikation von Antibiotica, die mit DMSO viel schneller, tiefer und in höheren Konzentrationen das Euterparenchym durchdringen als mit anderen Lösungsmitteln und länger im Gewebe verweilen.

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A) Methodik

Für die Versuche standen mehrere Kühe der Rassen Deutsches Fleckvieh und Deutsches Braunvieh im Alter zwischen 3 und 7 Jahren zur Verfügung. Die Laktationsstadien erstreckten sich von kurz nach der Geburt bis kurz vor dem Trockenstellen. Die Milchleistung der Tiere lag zwischen 9 und 12 kg pro Tag.

Vor jedem Versuch wurden Viertelgemelksproben von den Tieren entnommen und diese mittels des Schalm-Testes auf eventuell erhöhten Zellgehalt untersucht. In einigen Fällen ergab sich für einzelne Viertel eine positive Reaktion. Ansonsten zeigten die Tiere keine Anzeichen einer Mastitis und keine Störung des Allgemeinbefindens.

1. Geprüfte Antibiotica

Folgende Antibiotica wurden auf ihre Penetrationsfähigkeit durch die Euterhaut der Kuh mittels DMSO untersucht:

a) Aureomycin = Chlortetracyclin-HCl (Cyanamid)
b) Dihydrostreptomycin-Lösung (Rentschler)
c) Erythrocin = Erythromycin (Abbott)
d) Mamyzin = Benzylpenicillin-Diäthylaminoäthylesterhydrojodid (Löwens)

Ausgangslösung zur Herstellung der verschiedenprozentigen DMSO-Lösungen war eine 90%ige wässrige Lösung von DMSO der Firma Grünenthal.

2. Lösungsvermögen der einzelnen Antibiotica in DMSO

Das Aureomycin-Konzentrat war ein sehr feinkörniges, gelbes Pulver, das sich nach kurzem Umrühren mit dem Glasstab gut in DMSO in allen Konzentrationen löste. Die Lösung war gelblich gefärbt.

Die Streptomycin-Lösung vermischte sich gut mit DMSO in Konzentrationen unter 70%. Bei 30%igem DMSO war die

Mischung farblos, bei 60%igem DMSO weißlich und bei 70%igem DMSO milchig-trüb, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete, der aber nach kurzem Erwärmen verschwand. Beim Mischen mit 80%igem DMSO bildeten sich zähe Schlieren, die auch bei leichtem Erwärmen nicht verschwanden. Eine längere Erwärmung der Lösung war aber nicht möglich, da sonst das Streptomycin seine antibiotischen Eigenschaften verloren hätte. Mit 90%-igem DMSO entstand ein unlöslicher Klumpen, so daß die Mischung nicht mehr auf das Euter aufzutragen war.

Beim Vermischen von Erythrocin mit DMSO in Konzentrationen von 40% und 45% zeigte sich keine Reaktion; die Mischung war schwach gelblich gefärbt. Bei DMSO-Konzentrationen über 60% bildeten sich mit Erythrocin leichte Schlieren, die aber wieder verschwanden. Die Mischung war bei diesen DMSO-Konzentrationen dickflüssig. Alle Mischungen von DMSO mit Erythrocin hatten einen widerlichen Geruch. Verdünnte man 90%iges DMSO mit Aqua dest. auf 30% und gab dann das Erythrocin dazu, so entstand ein weißer, flockiger Niederschlag, der bei längerem Erhitzen jedoch verschwand. Da reines Erythrocin mit DMSO im Reagenzglas aber nicht reagiert, so ist diese Ausfällung auf den großen Anteil von Wasser bei der Verdünnung von DMSO auf 30% zurückzuführen. Eine Probe im Reagenzglas zeigte, daß Erythrocin mit Aqua dest. durch Ausfällung reagiert. Da ein längeres Erhitzen vermieden werden sollte, wurde DMSO mit 70%igem Alkohol verdünnt. Auf diese Weise ließ es sich mit Erythrocin mischen. Anfängliche Schlieren verschwanden, die Lösung war klar, gelblich gefärbt und von öliger Konsistenz.

Mamyzin ließ sich mit DMSO in jeder Konzentration gut mischen. Die Lösung war weiß und bei DMSO-Konzentrationen ab 60% etwas dickflüssig.

3. Versuchsanordnung

Die jeweilige Versuchslösung wurde kurz vor Beginn des Versuches in einem Erlenmeyerkolben hergestellt. Die Euter wurden nicht gereinigt, lediglich stark verschmutzte Euterviertel wurden mit einem nassen Schwamm abgerieben und mit Zellstoff getrocknet.

Vor dem Auftragen der Versuchslösung wurden Leerproben von jedem Viertel entnommen, um einen etwa vorhandenen Antibiotica-Spiegel (evtl. durch Medikamente) oder Eigenhemmung der Milch feststellen zu können. Dann wurde die Lösung möglichst gleichmäßig mittels eines Pinsels auf das Euter aufgebracht. Nachdem sie vollständig auf dem Euter verteilt worden war, wurden in bestimmten Zeitabständen Milchproben aus jedem Viertel in vorher gekennzeichnete, sterile, mit Zellstoff-Pfropfen verschlossene Reagenzgläser entnommen. Die ersten Milchstrahlen wurden verworfen. Da sich die Versuche mit Mamyzin über längere Zeit erstreckten, war es nicht möglich, sie ohne Zwischenmelken durchzuführen. Der Zeitpunkt des Melkens ist jeweils bei den Versuchen vermerkt.

Die gesammelten Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank bei etwa + 4° C aufbewahrt und nach spätestens 24 Stunden weiterverarbeitet. Sie wurden dann im Agar-Diffusions-Verfahren auf ihre Keimhemmung bzw. auf ihren Gehalt an Antibiotica untersucht.

Eine mögliche Eigenhemmung der Milch auf das Wachstum des verwendeten Testkeims, Bacillus subtilis, war durch frühere Versuche von KIRSCHMER (18) ausgeschlossen worden. Auch eine Hemmung des Wachstums des Testkeims durch DMSO (90%) allein war nach WALSER (37) und KIRSCHMER (18) nicht möglich.

4. Lochplattentest

Zur Bestimmung des Antibiotica-Gehaltes der entnommenen Milchproben wurde das Agardiffusionsverfahren auf einer einschichtigen, beimpften Agarplatte verwendet. Diese Methode ist nach MEEWES und MILOSCVIC (zit. nach STORGARDS, 34) besonders gut zur Antibiotica-Bestimmung geeignet. Verwendet wurde Antibiotic Medium I (Bacto-Penassy Seed Agar, dehydrated) der Difco-Laboratories, Detroit. Als Testkeim wurde Bacillus subtilis ATCC 6633 verwendet.

5. Herstellung der Sporensuspension

Die Herstellung der Sporensuspension erfolgte nach KIRSCHBAUM und Mitarb., wobei der Testkeim Bac. subtilis ATCC 6633 auf Schrägagar (Merck Standard I) überimpft und ca. 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank bebrütet wurde. Mit 5-10 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung wurde dann das Wachstum eines Schrägagarröhrchens abgeschwemmt und in eine Roux-Flasche mit ca. 300 ml Merck-Standard-I-Agar überimpft. Durch sterile Glasperlen wurde eine gleichmäßige Verteilung der Abschwemmung auf der Agarschicht erzielt. Nachdem die Roux-Flasche 5 Tage lang bei 37°C im Brutschrank bebrütet worden war, wurde das Wachstum mit 50 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung abgespült. Die Sporensuspension wurde bei 3000 U/Min. zentrifugiert, der flüssige Teil abgegossen, der Rückstand mit 50 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der überstehende Teil wurde abgegossen und die Sporen in ca. 70 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Diese Sporensuspension wurde nun in einen sterilen Erlenmeyerkolben mit Glasperlen verbracht und gut mit abgeflammter, doppelter Alu-Folie verschlossen. Zur Abtötung der vegetativen Zellen wurden die Sporen 60 Minuten auf 65°C erwärmt. Danach ist die Sporensuspension einige Monate lang im Kühlschrank haltbar.

Die Impfstärke pro Agarplatte mußte für jede Suspension neu eingestellt werden. Sie betrug etwa 0,1 - 0,4 ml Suspension pro 100 ml Agar. Bei den durchgeführten Versuchen wurde mit einer Impfstärke von anfangs 0,8 ml pro 400 ml Agar und später 0,4 ml pro 400 ml Agar gearbeitet.

6. Herstellung der Agar-Platten

Nachdem der auf den Arbeitstisch aufgelegte, in der Höhe verstellbare Aufsatz mit der Wasserwaage genau horizontal eingestellt worden war, wurden jeweils 4 ebene Glasplatten ausgelegt. Auf jede dieser Glasplatten wurden 2 Plexiglasringe (Innendurchmesser 190 mm, Höhe 20 mm) gelegt und zur besseren Haftung leicht angedrückt. Die von den Ringen begrenzte Fläche sowie die Innenseite der Ringe wurden zur Keimfreimachung mit dem Bunsenbrenner abgeflammt.

Anschließend wurde jeder Ring mit 50 ml des beimpften Agars ausgegossen. Die optimale Temperatur zum Gießen des Agars lag bei etwa 67°C. Nach dem vollständigen Erkalten und Erhärten des Agars wurden mit einem Metallrohr (Durchmesser 11 mm) pro Platte 12 Löcher in regelmäßigen Abständen eingestanzt. Die ausgestochenen Agarplättchen wurden mit einer sterilen Öse aus der Platte gehoben. In die so entstandenen Löcher wurde mit sterilen Pipetten jeweils 0,1 ml der zu untersuchenden Milchproben pipettiert. Dabei wurde jede Probe 6-fach getestet.

7. Versuchsauswertung

Zu jeder Versuchsreihe wurde eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen angesetzt. Sie wurde mit Aureomycin, Streptomycin und Erythrocin in den Konzentrationen 1 mg; 0,1 mg; 0,01 mg; 1 µg; 0,1 µg; 0,01 µg und 0,001 µg angesetzt und für Mamyzin in den Konzentrationen 100; 10; 1; 0,1 und 0,01 I.E.

Dabei wurde die jeweilige Ausgangslösung mit Puffer hergestellt, die weiteren Verdünnungen jedoch mit Milch, da Milch und Puffer unterschiedlich in die Agarplatten diffundieren und sich daher eine unterschiedliche Keimhemmung ergibt.

Die mit den Milchproben bzw. der Standardreihe beschickten Platten wurden etwa 15 Stunden bei 37°C im Brutschrank bebrütet und die Hemmhofdurchmesser danach mittels eines Lineals in Millimetern abgemessen. Die so erhaltenen Werte wurden in entsprechende Tabellen eingetragen. Die Werte der Standardreihe wurden auf Millimeterpapier übertragen und linear zur Eichkurve verbunden. Mit Hilfe dieser Eichkurve konnten dann die ermittelten Hemmhofwerte der Proben ausgedrückt werden. Nach Beendigung einer jeden Versuchsreihe wurden die verwendeten Glaswaren bei 180 - 200°C zwei Stunden lang im Autoklaven trocken erhitzt, um sie zu sterilisieren und eventuell zurückgebliebene Antibiotica-Spuren zu vernichten.

B) Ergebnisse

1. Untersuchungen mit Aureomycin

Zur Verwendung kam Aureomycin-Konzentrat, ein gelbes, feinkörniges Pulver, das sich in DMSO in allen Konzentrationen gut löste. Hierbei entsprachen 10 g Pulver einer Aureomycin-Konzentration von 550 mg.

a) Zunächst wurden 10 g Konzentrat in 20 ml 60%igem DMSO gelöst und auf die Euterhaut aufgetragen. Nach 10 Minuten zeigten alle 4 Viertel eine Antibiotica-Ausscheidung, die zwischen 0,1 µg und 0,003 µg lag. Nach 20 und nach 30 Minuten sanken die Ergebnisse aller Viertel auf 0, um nach 1 Stunde in einem Viertel wieder leicht anzusteigen. Nach 2 Stunden waren nur noch Antibiotica-Spuren zu sehen, und alle weiteren Proben erbrachten keine Ergebnisse mehr (s. Tab. 1).

Tabelle 1

Menge ausgeschiedenen Aureomycins nach Auftragen von 10 g Aureomycin-Konzentrat, gelöst in 20 ml DMSO(60%) (in µg/ml)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	0,06	0	0,1	0,003
20 Minuten	0	0	0	0
30 Minuten	0	0	0	0
1 Stunde	0	0	Spur	Spur
2 Stunden	Spur	Spur	Spur	Spur
3 Stunden	0	0	0	0
4 Stunden	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

b) 10 g Konzentrat wurden in 30 ml DMSO von der Konzentration 60% gelöst und auf die Euterhaut aufgetragen. Nach 10 Minuten zeigten alle 4 Viertel einen Antibiotica-Spiegel, der zwischen 0,085 ug und 0,05 ug lag. Alle weiteren Proben (letzte Entnahme nach 4 Stunden) wiesen keine meßbaren Ergebnisse mehr auf (s. Tab. 2).

Tabelle 2

Menge ausgeschiedenen Aureomycins in µg/ml nach Auftragen von 10 g Aureomycin-Konzentrat, gelöst in 30 ml DMSO(60%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	0,065	0,05	0,085	0,065
20 Minuten	0	Spur	0	Spur
30 Minuten	0	0	0	0
1 Stunde	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

c) Für DMSO-Konzentrationen unter 60% (30%, 45%) sowie für Konzentrationen über 60% (70%, 80%, 90%) konnten bei gleichbleibender Menge Aureomycin keine meßbaren Ergebnisse festgestellt werden.

d) Die Aureomycin-Konzentrat-Menge von 10 g wurde auf 20 g erhöht (20 g Konzentrat entsprechen 1100 mg reinem Aureomycin), während die Menge des Lösungsmittels gleich blieb (30 ml). Bei einer DMSO-Konzentration von 60% ließen sich nach 10 Minuten Werte zwischen 0,065 µg und Spuren nachweisen, und nach 20 Minuten lagen die Werte zwischen 0,0025 µg und Spuren. Ähnlich sahen die Werte nach 30 Minuten aus, wobei auffiel, daß in einem Viertel der Wert auf 0,025 µg anstieg. Nach 1 Stunde zeigte nur noch ein Viertel einen Antibiotica-Spiegel von 0,01 µg. Alle anderen Viertel wiesen keine meßbaren Ergebnisse mehr auf. Auch weitere Probenentnahmen lieferten keine Ergebnisse mehr, wenngleich in verschiedenen Vierteln ab und zu eine Antibiotica-Spur nachzuweisen war (s. Tab. 3).

Tabelle 3

Menge ausgeschiedenen Aureomycins in µg/ml nach Auftragen von 20 g Aureomycin-Konzentrat, gelöst in 30 ml DMSO(60%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	0	0,065	Spur	0,065
20 Minuten	0,0025	Spur	Spur	Spur
30 Minuten	0,0025	Spur	0,025	0
1 Stunde	0,01	0	0	0
2 Stunden	Spur	0	0	0
3 Stunden	Spur	0	0	0
4 Stunden	Spur	0	0	0
5 Stunden	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von KIRSCHMER (18) insofern überein, als Ausscheidungsdauer und Höhe der ausgeschiedenen Menge eines Antibioticums zwischen den einzelnen Vierteln beträchtlich schwankten. Ebenfalls in Übereinstimmung mit KIRSCHMER war festzustellen, daß die Werte in einem Viertel auf 0 absinken können, um dann einige Zeit später wieder mehr oder weniger anzusteigen.

e) Derselbe Versuch (20 g Aureomycin-Konzentrat, gelöst in 30 ml DMSO/60%) verlief bei einer Wiederholung an einer anderen Kuh mit noch größeren Schwankungen der Ergebnisse der einzelnen Viertel: nach 10 Minuten ergaben sich Werte zwischen 0,35 µg und 0,0075 µg, nach 20 Minuten zeigte nur noch ein Viertel einen Wert von 0,0015 µg, während nach 30 Minuten dieses Viertel nur noch eine Antibiotica-Spur aufwies, die anderen 3 Viertel hingegen Werte zwischen 0,004 µg und Spuren. Diese Werte, die alle bereits weit unter der therapeutisch wirksamen Dosis lagen, sanken unregelmäßig ab und lagen nach 4 Stunden bei 0 (s. Tab. 4).

Tabelle 4

Menge ausgeschiedenen Aureomycins in µg/ml nach Auftragen von 20 g Aureomycin-Konzentrat, gelöst in 30 ml DMSO(60%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	0,35	0	0,0075	0,085
20 Minuten	0,0015	0	0	0
30 Minuten	Spur	0,0035	Spur	0,004
1 Stunde	0,01	0	0,005	0,001
2 Stunden	0,085	0	Spur	0
3 Stunden	Spur	Spur	Spur	0
4 Stunden	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

f) Weitere Versuche mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen (30%, 45%, 70%, 80%, 90%) brachten keinerlei Ergebnisse. Somit ließen sich nur bei einer DMSO-Konzentration von 60% sehr geringe Konzentrationen des ausgeschiedenen Antibioticums in der Milch nachweisen.

2. Untersuchungen mit Dihydrostreptomycin

Zur Verwendung kam Dihydrostreptomycin-Lösung der Firma Rentschler, wobei 5 ml der Lösung einer Streptomycin-Konzentration von 1000 mg entsprachen.

a) Beim ersten Versuch wurden 5 ml der Dihydrostreptomycin-Lösung mit 15 ml 60%igem DMSO vermischt und auf die Euterhaut aufgetragen. Nach 10 Minuten zeigten 2 Viertel kein Ergebnis, ein Viertel wies eine Antibiotica-Ausscheidung von 1,0 µg auf und eines von 5,5 µg. Alle weiteren Proben erbrachten keine Ergebnisse (s. Tab. 5).

Tabelle 5

Menge ausgeschiedenen Streptomycins in µg/ml nach Auftragen von 5 ml Dihydrostreptomycin-Lösung, gemischt mit 15 ml DMSO(60%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel C
10 Minuten	0	5,5	1,0	0
20 Minuten	0	0	0	0
30 Minuten	0	0	0	0
1 Stunde	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

b) Nach Erhöhung der Menge Dihydrostreptomycin-Lösung von 5 ml auf 10 ml (dies entsprach einer Streptomycin-Konzentration von 2000 mg) ließ sich nach Mischen mit 60%igem DMSO und Auftragen auf die Euterhaut nach 10 Minuten in der Milch aller 4 Viertel eine Antibiotica-Konzentration von 1,0 µg/ml nachweisen (s. Tab. 6).

Tabelle 6

Menge ausgeschiedenen Streptomycins in µg/ml nach Auftragen von 10 ml Dihydrostreptomycin-Lösung, gemischt mit 15 ml DMSO(60%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	1,0	1,0	1,0	1,0
20 Minuten	0	0	0	0
30 Minuten	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

Bei einer anderen Kuh lag die Antibiotica-Ausscheidung nach Auftragen derselben Lösung nach 10 Minuten in 2 Vierteln sogar bei 9,0 µg/ml. Auch hier waren weitere Proben ergebnislos.

c) Eine Mischung aus 5 ml Streptomycin-Lösung und 15 ml DMSO/30% lieferte keinerlei Ergebnisse. Wurde hingegen dieselbe Menge Streptomycin-Lösung mit 20 ml DMSO von der Konzentration 30% gemischt und aufgetragen, so war nach 10 Minuten auf 2 Vierteln eine Ausscheidung von 4,0 ug bzw. 15,0 µg festzustellen, während die beiden anderen Viertel sowie alle folgenden Proben keine Ausscheidung zeigten (s. Tab. 7).

Tabelle 7

Menge ausgeschiedenen Streptomycins in µg/ml nach Auftragen von 5 ml Dihydrostreptomycin-Lösung, gemischt mit 20 ml DMSO (30%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	4,0	0	15,0	0
20 Minuten	Spur	0	0	0
30 Minuten	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

d) Bei DMSO-Konzentrationen von 45%, 70% und 80% war keine antibiotische Wirkung in den Milchproben festzustellen. Ein Versuch mit 90%igem DMSO war nicht durchführbar, da DMSO in dieser Konzentration sehr stark mit der Dihydrostreptomycin-Lösung reagierte und die Mischung nicht auf die Euterhaut aufzubringen war.

3. Untersuchungen mit Erythromycin

Zur Verwendung kam Erythrocin vet. 100 der Firma Abbott, eine Erythromycin-Lösung. 1 ml der Lösung entsprach 100 mg Erythromycin.

a) 10 ml der Lösung (= 1000 mg Erythromycin) wurden mit 15 ml 60%igem DMSO gemischt und auf die Euterhaut einer

Kuh aufgetragen. Nach 10 Minuten war bei 2 Vierteln keine Antibiotica-Ausscheidung festzustellen, bei 2 Vierteln lag sie bei 4,0 µg bzw. 9,5 µg. Nach 20 Minuten lag die Ausscheidung in einem Viertel bei 1,0 µg, bei den anderen bei 0. Alle weiteren Proben zeigten keine Ausscheidung mehr (s. Tab. 8).

Tabelle 8

Menge ausgeschiedenen Erythromycins in µg/ml nach Auftragen von 10 ml Erythrocin, gemischt mit 15 ml DMSO(60%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	4,0	9,5	0	0
20 Minuten	1,0	0	0	0
30 Minuten	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

b) Wurde die Menge des 60%igen DMSO von 15 ml auf 10 ml reduziert, so ließ sich noch nach 1 Stunde auf einem Viertel eine Antibiotica-Ausscheidung von 1,8 µg feststellen. Nach 2 Stunden und bei allen weiteren Probenentnahmen konnte keine Ausscheidung nachgewiesen werden (s. Tab. 9).

Tabelle 9

Menge ausgeschiedenen Erythromycins in µg/ml nach Auftragen von 10 ml Erythrocin, gemischt mit 10 ml DMSO(60%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	1,0	0	1,0	0
20 Minuten	1,0	1,5	1,0	1,0
30 Minuten	1,0	0	0	0
1 Stunde	1,8	0	0	0
2 Stunden	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

c) Wurden 10 ml Erythrocin mit 15 ml 70%igem DMSO gemischt und aufgetragen, so ergaben sich stark schwankende Werte, deren Maximum nach 1 Stunde bei 5,0 µg in einem Viertel lag. Nach 4 Stunden zeigten alle Viertel keine Ausscheidung mehr (s. Tab. 10).

Tabelle 10

Menge ausgeschiedenen Erythromycins in µg/ml nach Auftragen von 10 ml Erythrocin, gemischt mit 15 ml DMSO(70%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	0	0	4,5	0
20 Minuten	1,0	0	0,8	0
30 Minuten	0	0,8	0	0
1 Stunde	0	0	2,5	5,0
2 Stunden	0	0,8	3,5	0
3 Stunden	0	0	0,8	0
4 Stunden	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

d) Derselbe Versuch wurde mit 80%igem DMSO durchgeführt, wobei fast nur Werte um 1,0 µg gemessen wurden. (S. Tab. 11)

Tabelle 11

Menge ausgeschiedenen Erythromycins in µg/ml nach Auftragen von 10 ml Erythrocin, gemischt mit 15 ml DMSO(80%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	3,5	0	0	0
20 Minuten	0	0	0,9	0
30 Minuten	0	0,8	0,9	0
1 Stunde	0,7	0,8	0,8	0,6
2 Stunden	0	0	0	0
3 Stunden	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

e) Beim Mischen von Erythrocin mit 30%igem bzw. 40%-igem DMSO entstand eine zähe, weiße Ausflockung, die auf den hohen Anteil an Wasser zurückzuführen war, das zur Verdünnung des ursprünglich 90%igen DMSO nötig war. Wurde dagegen DMSO mit 70%igem Alkohol verdünnt, so ließ es sich nach anfänglicher Schlierenbildung gut mit Erythrocin mischen. Die entstandene Lösung war gelblich und ölig. Die mit der Milch ausgeschiedene Menge Erythromycin war bei DMSO/30% gering, ließ sich allerdings in einem Viertel bis zu 3 Stunden nachweisen (s. Tab. 12).

Tabelle 12

Menge ausgeschiedenen Erythromycins in µg/ml nach Auftragen von 10 ml Erythrocin, gemischt mit 15 ml DMSO(30%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	0	0	0	1,5
20 Minuten	0	0	0	1,0
30 Minuten	0	0	0,75	0
1 Stunde	0	0	2,0	0
2 Stunden	0	0	Spur	0
3 Stunden	0	0	1,5	0
4 Stunden	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

f) Eine Erhöhung der Erythrocin-Menge von 10 ml auf 15 ml (= 1500 mg Erythromycin) brachte eine leichte Steigerung der Werte. Das Maximum war nach 1 Stunde festzustellen (s. Tab. 13).

Tabelle 13

Menge ausgeschiedenen Erythromycins in µg/ml nach Auftragen von 15 ml Erythrocin, gemischt mit 15 ml DMSO(30%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	0	0,75	2,5	0
20 Minuten	0	0,75	1,5	0,95
30 Minuten	4,5	0,75	3,0	1,5
1 Stunde	6,5	1,8	3,5	1,0
2 Stunden	0	0	0	0
3 Stunden	0	0	0	0
4 Stunden	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

g) Wurde 45%iges DMSO verwendet, so waren die Ergebnisse sowohl mit 10 ml Erythrocin (= 1000 mg Erythromycin) als auch mit 15 ml Erythrocin (= 1500 mg Erythromycin) sehr gering (s. Tab. 14 und 15).

Tabelle 14

Menge ausgeschiedenen Erythromycins in µg/ml nach Auftragen von 10 ml Erythrocin, gemischt mit 15 ml DMSO(45%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	0,6	0	1,0	0,5
20 Minuten	0	0	0	0
30 Minuten	0	0	0,85	0
1 Stunde	0,7	0	0,65	0
2 Stunden	0,6	0	5,5	0,5
3 Stunden	0,6	0,5	0	0
4 Stunden	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

Tabelle 15

Menge ausgeschiedenen Erythromycins in µg/ml nach Auftragen von 15 ml Erythrocin, gemischt mit 10 ml DMSO(45%)

Zeit der Probenentnahme	Viertel A	Viertel B	Viertel C	Viertel D
10 Minuten	0	0	1,5	0
20 Minuten	0	0	0	0
30 Minuten	0	0,75	0	0
1 Stunde	0	0	0	0,75
2 Stunden	0	0	0	0
3 Stunden	0	0	0	0

Die Kuh wurde während der Probenentnahmen nicht gemolken.

4. Untersuchungen mit Mamyzin

Zur Verwendung kam Mamyzin forte krist. ad us. vet. der Firma Löwens, Kopenhagen, in Lizenz hergestellt von der Firma Veterinaria. Es lag in Form einer Trockensubstanz vor. 5 g dieser Trockensubstanz enthielten 5 Mio. I.E. Benzylpenicillin-Diäthylaminoäthylesterhydrojodid und wurden mit 15 ml Aqua bidest. aufgelöst.

a) Im Verlauf der folgenden Untersuchungen wurde die Menge von 5 Mio. E. Mamyzin konstant gehalten, während DMSO in verschiedenen Konzentrationen zur Anwendung kam. Zunächst wurden 5 g der Trockensubstanz in 15 ml Aqua bidest. aufgelöst, mit 10 ml 90%igem DMSO vermischt und auf die Euterhaut einer Kuh aufgetragen. Die hierbei erhaltenen Werte sind in den Tabellen 16 und 17 zusammengestellt.

Der Tabelle 16 ist zu entnehmen, daß in allen Eutervierteln bis etwa 12 Stunden nach der Applikation Penicillin nachweisbar ist. Das Maximum wird bei den einzelnen Vierteln unterschiedlich zwischen 30 Minuten und 4 Stunden nach dem Auftragen der Lösung erreicht. Es liegt zwischen 0,25 und 4,0 I.E./ml.

In Tabelle 17 liegt bei etwa gleicher Ausscheidungsdauer das Maximum in den einzelnen Vierteln zwischen 4,0 und 10,0 I.E. in der Zeit von 30 Minuten bis 2 Stunden nach Applikation. Der Wert von 80 I.E. in Versuch A bleibt außer Betracht.

b) Da es für die Mastitistherapie von großer Wichtigkeit ist, das applizierte Antibioticum möglichst lange auf einem therapeutisch wirksamen Spiegel im Eutergewebe zu halten, wurde folgende Untersuchung angestellt:
Es wurden 5 Mio. E. Mamyzin auf die Euterhaut einer Kuh aufgetragen, und nach 60 Stunden wurde diese Verabreichung an der gleichen Kuh wiederholt. Die Milchentnahme nach 60 Stunden wies eine Ausscheidung in Spuren auf. Nach der nächsten Entnahme, also nach 72 Stunden, war nur in einem Viertel ein Anstieg auf 0,03 I.E. nach 108 Stunden auf 0,5 I.E. nachzuweisen. Nach 120, 132 und 144 Stunden war keine Ausscheidung mehr festzustellen (s.Tab.18). Durch nochmaliges Einstreichen des Euters mit der gleichen Versuchslösung 60 Stunden nach der Erstbehandlung ließ sich demnach der Penetrationseffekt nicht in gleichem Maße wiederholen.

d) Als nächstes sollte untersucht werden, ob eine DMSO-Konzentration von 80% die Penetration von Mamyzin durch die Euterhaut ins Euter wesentlich erhöht. Wieder wurden 5 Mio. I.E. Mamyzin in Aqua bidest. gelöst und mit 10 ml DMSO/80% gemischt (Tab.19). Die Ergebnisse sind vergleichbar denen aus den Versuchen mit 90%igem DMSO. Das Maximum der Penicillin-Konzentrationen lag zwischen 0,25 und 10,0 I.E. in der Zeit von 30 Minuten bis 2 Stunden nach der Applikation. Nach 72 Stunden und nach 108 Stunden konnten Spuren nachgewiesen werden. Die nach 120, 132 und 144 Stunden entnommenen Proben erbrachten keine meßbaren Werte mehr.

d) Ähnlich unregelmäßig sahen die Ausscheidungswerte aus, wenn statt 80%igem DMSO 70%iges verwendet wurde (Tab.20). Das Ausscheidungsmaximum lag in derselben Größenordnung wie in den vorhergehenden Versuchen. (Ein Wert mit 80 I.E. wurde nicht berücksichtigt.) nach 84 Stunden war keine Ausscheidung mehr festzustellen. Nach 96 Stunden konnten lediglich Spuren gemessen werden.

e) Durchwegs geringe Penicillinkonzentrationen ergaben sich in einem Versuch mit 60%igem DMSO. Die maximale Ausscheidung betrug hier zwischen 0,01 und 0,5 I.E. nach 1 bis 3 Stunden. Spuren waren bis zu 48 Stunden nach Applikation nachweisbar.

Demgegenüber lagen die maximalen Penicillinkonzentrationen in den Versuchen der Tabellen 22 und 23 in einer Höhe, die den bei höher konzentriertem DMSO gefundenen Werten nahekommt. (2,0 bis 6,0 I.E. bzw. 0,5 bis 1,0 I.E.). Die Ausscheidungsdauer war im Versuch der Tabelle 23 allerdings sehr kurz. 24 Stunden nach Applikation war keine Hemmwirkung mehr nachweisbar.

f) Auch bei Verwendung von 45%igem DMSO (Tab.24) lagen die maximalen Penicillinkonzentrationen in den einzelnen Vierteln zwischen 0,8 und 7,5 I.E. Spuren waren bis zu 24-36 Stunden nach der Applikation nachweisbar.

Das Euter der für den obigen Versuch verwendeten Kuh war ausnehmend stark behaart, während alle sonstigen im Laufe der Untersuchung verwendeten Kühe ein mäßig bis schwach behaartes Euter aufwiesen. Die Frage, ob sich die Behaarung des Euters auf das Penetrationsvermögen der auf die Euterhaut aufgebrachten Substanzen auswirkt, kann hier jedoch nicht geklärt werden, da einerseits Vergleichsmöglichkeiten fehlen, andererseits die großen individuellen Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchstieren hierüber keine Schlüsse zulassen.

g) Mit DMSO in 30%iger Konzentration war eine Penicillinkonzentration erreichbar, die maximal in den einzelnen Vierteln zwischen 0,4 und 10,0 I.E. lag (Tab.25 und 26). Zwei extrem hohe Werte im Versuch der Tabelle 26, Viertel C mit 100 und 35 I.E., wurden nicht berücksichtigt. Bei einem Teil der Viertel war jedoch Penicillin bereits nach 4-6 Stunden nur noch in Spuren nachweisbar. 24 Stunden nach der Applikation war in 6 von 8 Vierteln kein Antibioticum mehr nachweisbar.

Tabelle 16

Penicillinausscheidung in der Milch nach kutaner Verabreichung von Mamyzin (I.E./ml), gelöst in 15 ml Aqua bidest., gemischt mit 10 ml DMSO(90%)

Verabr. P.Menge	Viertel	30 Min.	Stunden nach der Verabreichung 1	2	3	4	6*	8	12*	24*	36*	48*	60*	72*	84*
5 Mio.	A	Spur	0,07	0,055	0,085	0,75	0,5	0,015	Spur	0	0	0	0	0	0
I.E.	B	0,01	0,25	4,0	0,07	0,25	0,04	0,01	0,07	0,015	0	0	0	0	0
	C	0,01	0,1	0,055	0,5	0,04	0,5	0,055	Spur	0	0	0	0	0	0
	D	0,25	0,25	0,07	0,07	0,085	Spur	0,085	0,085	0	0	0	0	0	0

* = Kuh wurde vor der Probenentnahme gemolken

Versuchsdauer 144 Stunden

Tabelle 17

Penicillinausscheidung in der Milch nach kutaner Verabreichung von Mamycin (I.E./ml), gelöst in 15 ml Aqua bidest., gemischt mit 10 ml DMSO(90%)

Verabr. P.Menge	Viertel	30 Min.	Stunden nach der Verabreichung 1	2	3	4	6*	8	12*	24*	36*	48*	60*	72*	84*	96*	108*	120*
5 Mio.	A	10,0	80,0	2,0	0,5	0,07	0,25	0,055	4,0	Spur	0	0	0	0	0	0	0	0
I.E.	B	0,5	0,75	6,0	0,07	0,5	1,0	0,07	0,5	Spur	Spur	0,01	0	0	0	0	0	0
	C	0,75	4,0	4,0	0,1	1,0	0,5	0,07	1,0	0,01	0	0	Spur	0	0	0	0	0
	D	8,0	2,0	10,0	1,0	0,5	0,055	0,5	0,07	Spur	0,015	Spur	Spur	0	0	0	0	0

* = Die Kuh wurde vor der Probenentnahme gemolken

Versuchsdauer: 168 Stunden

Tabelle 18

Penicillinausscheidung in der Milch nach kutaner Verabreichung von Mamyzin (I.E./ml), gelöst in 15 ml Aqua bidest., gemischt mit 10 ml DMSO(90%)
Die Verabreichung wurde nach 60 Stunden wiederholt.

Verabr. P.Menge	Viertel	30 Min.	Stunden nach der Verabreichung 1	2	3	4	6*	8	12	24	36*	48*	60*	72*	84*	96*	108*	120*
5 Mio.	A	Spur	1,0	0,1	1,0	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur	0	0	Spur	0	0	0	
I.E.	B	0,03	10,0	0,01	0,75	Spur	0,01	Spur	0,1	Spur	0	Spur	0	Spur	0	Spur	0	0
	C	Spur	1,0	0,065	0,065	Spur	Spur	Spur	0,03	Spur	Spur	0	Spur	0,03	Spur	Spur	0,5	0
	D	Spur	1,5	0,1	0,5	Spur	0,03	Spur	0,065	Spur	0	0	0	Spur	0	Spur	0	0

* = Die Kuh wurde vor der Probenentnahme gemolken

Versuchsdauer: 156 Stunden

Tabelle 19

Penicillinausscheidung in der Milch nach kutaner Verabreichung von Mamyzin (I.E./ml), gelöst in 15 ml Aqua bidest., gemischt mit 10 ml DMSO(80%)

Verabr.	Vier-	30	Stunden nach der Verabreichung															
P.Menge	tel	Min.	1	2	3	4	6	8*	12	24	36*	48*	60*	72*	84*	96*	108*	120*
5 Mio.	A	7,0	0,5	0,03	0,03	0,1	Spur	0,065	0,065	Spur	0,01	Spur	0	Spur	Spur	0	0	0
I.E.	B	1,0	0,25	0,01	0,03	0,5	Spur	1,0	0,1	0,01	Spur	Spur	0	0	0	0	Spur	0
	C	10,0	6,5	1,5	0,5	0,25	0,5	0,1	0,1	0,01	Spur	0	0	Spur	0	0	0	0
	D	0,01	0,5	0,25	0,1	Spur	0,01	0,03	0,01	Spur	0,1	0	0	Spur	0	0	0	0

* = Die Kuh wurde vor der Probenentnahme gemolken

Versuchsdauer: 156 Stunden

Tabelle 20

Penicillinausscheidung in der Milch nach kutaner Verabreichung von Mamyzin (I.E./ml), gelöst in 10 ml Aqua bidest., gemischt mit 10 ml DMSO(70%)

Verabr. P.Menge	Viertel	30 Min.	Stunden nach der Verabreichung 1	2	3	4	6*	8	12	24*	36*	48*	60*	72*	84*	96*	108*
5 Mio.	A	0,15	80,0	0,07	0,8	0,035	0,3	10,0	0,07	0,15	0,1	Spur	0,07	0,01	0	Spur	0
	B	0,035	0,25	0,035	0,07	0,01	0,07	0,15	Spur	0,01	0,01	0	Spur	0	0	0	0
	C	0,3	2,0	0,5	0,15	0,07	0,8	0,035	Spur	Spur	Spur	0	0,07	0	0	0	0
	D	0,07	0,15	0,3	0,1	0,035	0,01	0,1	0,01	Spur	0	0	Spur	0	0	0	0

* = Die Kuh wurde vor der Probenentnahme gemolken
Versuchsdauer: 156 Stunden

Tabelle 21

Penicillinausscheidung in der Milch nach kutaner Verabreichung von Mamyzin (I.E./ml), gelöst in 15 ml Aqua bidest., gemischt mit 10 ml DMSO (60%)

Verabr. P.Menge	Viertel	30 Min.	1	2	3	4	6*	8	12	24*	36*	48*	60*	72*	84*	96*
							Stunden nach der Verabreichung									
5 Mio.	A	0,07	0,5	0,07	0,3	Spur	Spur	Spur	0,035	0	0	0	0	0	0	0
	B	Spur	0,5	1,0	0,65	0,15	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur	0	0	0	0
	C	Spur	Spur	Spur	0,01	Spur	Spur	Spur	Spur	0	Spur	Spur	0	0	0	0
	D	Spur	Spur	0,01	Spur	0,07	Spur	0,01	0,01	0,05	Spur	Spur	0	0	0	0

* = Die Kuh wurde vor der Probenentnahme gemolken
Versuchsdauer: 156 Stunden

Tabelle 22

Penicillinausscheidung in der Milch nach kutaner Verabreichung von Mamyzin (I.E./ml), gelöst in 15 ml Aqua bidest., gemischt mit 10 ml DMSO(60%)

Verabr.	Viertel	30 Min.	1	2	3	4	6	8*	12	24*	36*	48*	60*	72*	84*
		Stunden nach der Verabreichung													
5 Mio.	A	0,015	0,07	0,25	0,085	0,07	6,0	0,01	0,1	0,015	0	Spur	0	0	0
I.E.	B	Spur	0,055	0,1	4,0	0,085	0,085	0,07	0,07	0,07	0,015	Spur	0,015	0	0
	C	0,5	2,0	1,0	0,085	0,085	0,085	0,04	0,03	0,03	0	0	0	0	0
	D	0,5	1,0	6,0	0,1	0,5	0,1	0,03	0,25	0,015	0,01	Spur	0	0	0

* = Die Kuh wurde vor der Probenentnahme gemolken
Versuchsdauer: 144 Stunden

Tabelle 23

Penicillinausscheidung in der Milch nach kutaner Verabreichung von Mamyzin (I.E./ml), gelöst in 15 ml Aqua bidest., gemischt mit 10 ml DMSO(60%)

Verabr. P.Menge	Viertel	30 Min.	Stunden nach der Verabreichung 1	2	3	4	6	8*	12	24*	36*	48*	60*	72*	84*	96*	108*	120*
5 Mio. I.E.	A	0,07	0,055	1,0	0,1	0,015	0,085	0,015	Spur	0	0	0	0,03	Spur	Spur	0,015	0	0
	B	0,07	0,1	0,25	0,055	0,07	0,5	0,03	Spur	0	0	0	Spur	Spur	0,055	0,015	Spur	0
	C	0,5	0,75	0,04	0,055	0,75	0,25	0,04	0,01	0	0	0	Spur	Spur	0,01	Spur	0,01	0
	D	0,75	0,1	0,1	0,5	0,03	0,1	0,015	0,03	0	0	Spur	Spur	Spur	0,01	Spur	0	0

* = Die Kuh wurde vor der Probenentnahme gemolken
Versuchsdauer: 168 Stunden
Die Verabreichung wurde nach 48 Stunden wiederholt.

Tabelle 24

Penicillinausscheidung in der Milch nach kutaner Verabreichung von Mamyzin (I.E./ml), gelöst in 15 ml Aqua bidest, gemischt mit 10 ml DMSO(45%)

Verabr.	Viertel	30 Min.	1	2	3	4	6*	8	12	24*	36*	48*	60*	72*
						Stunden nach der Verabreichung								
5 Mio.	A	0,01	0,01	0,2	0,8	0,2	Spur	Spur	Spur	Spur	0	0	0	0
I.E.	B	1,0	7,5	5,0	5,0	0,4	0,1	0,1	Spur	Spur	0	0	0	0
	C	1,0	0,4	2,5	0,4	0,4	0	Spur	0,8	0,1	Spur	0	0	0
	D	0,6	1,0	0,6	0,8	0,6	0,1	0	0,1	Spur	0	0	0	0

* = Die Kuh wurde vor der Probenentnahme gemolken

Versuchsdauer: 120 Stunden

Tabelle 25

Penicillinausscheidung in der Milch nach kutaner Verabreichung von Mamyzin (I.E./ml), gelöst in 15 ml Aqua bidest., gemischt mit 10 ml DMSO(30%)

Verabr.	Vier-	30	Stunden nach der Verabreichung									
P.Menge	tel	Min.	1	2	3	4	6	8*	12	24*	36*	48*
5 Mio.	A	Spur	0,4	0,2	0,4	0,1	0,02	Spur	0	0	0	0
I.E.	B	0,6	0,8	0,1	0,2	0,4	0,04	Spur	0,06	0	0	0
	C	0,8	0,8	0,1	0,2	0,06	Spur	Spur	0,04	0	0	0
	D	2,0	4,0	2,0	0,2	1,0	0,01	0,02	Spur	0	0	0

* = Die Kuh wurde vor der Probenentnahme gemolken
Versuchsdauer: 144 Stunden

Tabelle 26

Penicillinausscheidung in der Milch nach kutaner Verabreichung von Mamyzin (I.E./ml), gelöst in 10 ml Aqua bidest., gemischt mit 10 ml DMSO(30%)

Verabr. P.Menge	Viertel	30 Min.	Stunden nach der Verabreichung 1	2	3	4	6*	8	12	24*	36*	48*
5 Mio.	A	0,6	1,0	1,0	0,6	0,01	0,01	0	0	0	0	0
I.E.	B	0,1	0,2	2,5	0,1	0,01	0,01	0	0,4	0	0	0
	C	100,0	35,0	10,0	2,5	2,5	0,1	0,4	0,2	0,2	0	0
	D	1,0	0,2	0,2	0,2	Spur	Spur	0	0	Spur	0	0

* = Die Kuh wurde vor der Probenentnahme gemolken
Versuchsdauer: 144 Stunden

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die durchgeführten Versuche haben gezeigt, daß es nicht möglich ist, Aureomycin, Dihydrostreptomycin und Erythromycin in antibiotisch aktiver Form mit Hilfe von DMSO zuverlässig durch die Haut zu transportieren. Es konnten in allen Versuchen nur in einzelnen Proben sehr geringe Konzentrationen dieser Antibiotika in der Milch nachgewiesen werden.

Für Aureomycin ließ sich nur bei einer DMSO-Konzentration von 60% eine sehr geringe Hemmwirkung über kurze Zeit in der Milch nachweisen. Bei allen anderen geprüften Konzentrationen zwischen 30%igem und 90%igem DMSO war in der Milch keine antibiotische Konzentration feststellbar.

Bei Dihydrostreptomycin war nur bei Verwendung von 30%igem DMSO über sehr kurze Zeit eine geringe Penetration des Antibiotikums nachweisbar. Bei Verwendung von höher konzentriertem DMSO trat in keinem Falle antibiotisch wirksames Dihydrostreptomycin in der Milch auf.

Eine Ausscheidung von Erythromycin mit der Milch war nur bei einzelnen Eutervierteln verschiedener Kühe über kurze Zeit meßbar. Bei der unter Verwendung von Alkohol hergestellten 30%igen DMSO-Lösung lagen die Erythromycin-Konzentrationen am höchsten.

Im Gegensatz dazu konnte Mamyzin, eine Penicillin-Verbindung, mit DMSO als Penetrationsvermittler gut durch die Euterhaut in das Eutergewebe eingeschleust und in der Milch nachgewiesen werden.

Dabei war festzustellen, daß bei allen geprüften Konzentrationen des DMSO außerordentlich starke Schwankungen der Antibiotikum-Konzentrationen in der Milch sowohl zwischen den einzelnen Kühen als auch zwischen den Vierteln der gleichen Kuh auftraten.

Die in einzelnen Proben gemessenen sehr hohen Penicillin-Konzentrationen von 35, 80 und 100 I.E. können nur mit großem Vorbehalt aufgenommen und für die Bewertung nicht herangezogen werden.

Die erheblichen Streuungen der Werte zwischen den Euterviertel lassen nur eine vorsichtige Aussage über den Einfluß der DMSO-Konzentration auf das Maß der Penetration zu. Die höhere DMSO-Konzentration scheint eine längere Ausscheidungsdauer des Penicillins zu bewirken, während ein Einfluß auf die Ausscheidungshöhe nicht ersichtlich ist.

Eine Wiederholung der Applikation der Versuchslösungen nach 48 oder 60 Stunden hatte nur eine kurzfristige und geringgradige Penetration des Antibiotikums zur Folge. Die gemessenen Penicillin-Konzentrationen lagen weit unter denen nach der Erstbehandlung.

C) Diskussion

Abgesehen von der geringen Empfindlichkeit des hier angewandten Agar-Diffusionsverfahrens gegenüber sehr niedrigen Antibiotica-Konzentrationen (BRUNNER und MACHEK, 4) liefert dieses Verfahren doch einen guten Überblick darüber, ob überhaupt und in welchem Maße DMSO in der Lage ist, verschiedene Antibiotica durch die Euterhaut der Kuh zu transportieren. Aufgrund der vorliegenden und früheren Untersuchungen liegt die Vermutung nahe, daß nur Penicillin und penicillinhaltige Verbindungen mittels DMSO die Euterhaut durchdringen und im Euter angereichert werden können.

Die Ursachen einer fehlenden oder äußerst geringen Hemmwirkung in der Milch nach Verwendung von Aureomycin, Dihydrostreptomycin und Erythromycin können darin liegen, daß diese Antibiotika tatsächlich nicht in der Lage sind, die Haut unter dem Einfluß von DMSO in ausreichendem Maße zu penetrieren.

JACOB und ROSENBAUM (17) sowie SULZBERGER et al. (35) wiesen nach, daß die penetrationserhöhende Wirkung von DMSO abhängig ist von der Molekülgröße der einzuschleusenden Stoffe. Bezogen auf Antibiotica ergaben die vorliegenden Untersuchungen, daß Aureomycin mit einem Molekulargewicht von 478,9, Dihydrostreptomycin mit einem Molekulargewicht von 730,7 und Erythromycin mit einem Molekulargewicht von 733,9 nicht oder nur in Spuren in der Milch nachzuweisen waren, während der Penicillin-Ester Mamyzin mit einem Molekulargewicht von 561,5 sehr gut die Euterhaut penetrierte. Danach dürfte die Molekülgröße bei den geprüften Antibiotica für ein unterschiedliches Penetrationsvermögen keine entscheidende Bedeutung haben.

Es liegt vielmehr der Verdacht nahe, daß bei Aureomycin, Dihydrostreptomycin und Erythromycin die antibiotischen Eigenschaften unter der Einwirkung von DMSO so verändert

werden, daß diese Antibiotika im biologischen Test nicht mehr nachweisbar sind. Für diese Annahme sprechen insbesondere die Versuche mit Dihydrostreptomycin. Hier traten antibiotisch wirksame Substanzen bei Verwendung von 30%igem DMSO auf, während bei Verwendung von höher konzentriertem DMSO keine antibiotische Hemmwirkung in der Milch feststellbar war. Darüberhinaus war bei höheren Konzentrationen bereits makroskopisch eine Veränderung des DMSO-Antibioticum-Gemisches feststellbar.

Es ist somit in vorliegenden Untersuchungen nicht entschieden, ob Aureomycin, Dihydrostreptomycin und Erythromycin die Euterhaut nicht durchdringen können oder ob sie zwar penetrieren, jedoch durch DMSO ihre antibiotischen Eigenschaften verloren haben. Für die Praxis ist von Bedeutung, daß, unabhängig von den Ursachen, die genannten Antibiotica für die perkutane Anwendung in der Therapie der Mastitiden ausscheiden.

D) Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen über die kutane Resorption von vier verschiedenen Antibiotica unter dem Einfluß von DMSO durchgeführt. Die Versuche wurden an der Euterhaut gesunder, laktierender Kühe vorgenommen. Die Höhe der erzielten Resorption sowie die Verweildauer der Antibiotica im Euter wurden an den mit der Milch ausgeschiedenen Antibiotica-Konzentrationen durch Hemmstoffnachweis mittels Agar-Lochplattentest mit Bacillus subtilis als Testkeim gemessen.

Während sich mit Aureomycin, Dihydrostreptomycin und Erythromycin auch nach Erhöhung der Dosis nur kurzfristig sehr geringe Konzentrationen in der Milch ergaben, konnten mit dem Penicillin-Ester Mamyzin teilweise hohe Konzentrationen im Euter erreicht werden.

Höhere DMSO-Konzentrationen hatten eine längere Ausscheidungsdauer des Penicillins in der Milch zur Folge. Ein Einfluß auf die Ausscheidungshöhe war dagegen nicht nachweisbar.

Summary

This is a study on the percutaneous absorption of four formulas of antibiotics under the influence of Dimethyl-Sulfoxide (DMSO). The udder skin of healthy, lactating cows has been used for the experiments. The amount of absorption as well as the time the antibiotic remained in the udder, have been demonstrated by antibiotic concentrations in milk, using the agar hole method with Bacillus subtilis as a test organism.

The proof of inhibition was of poor result for Aureomycin, Dihydrostreptomycin and Erythromycin, even after raising the dosage. With Mamyzin, a Penicillin ester, partially high concentrations could be reached in the udder.

Higher concentrations of DMSO produced a longer time of excretion but no increase in concentration of Penicillin.

IV LITERATURVERZEICHNIS

1. BARKER S.A., CREWS S.J., MARSTERS J.B. und STACEY M., 1965:
Inhibition of Hyaluronic Acid Degradation by Dimethyl Sulfoxide
Nature 207, 1388-1389

2. BROWN V.K., ROBINSON J. und STEVENSON D.E., 1963:
A Note on the Toxicity and Solvent Properties of Dimethyl Sulfoxide
J. Pharmacy a. Pharmacol. 15, 688

3. BRUNNER R. und MACHEK G., 1962:
Die Antibiotika Band I, 242,
Verlag Hans Carl, Nürnberg

4. FABIANEK J. und HERP A., 1966:
Studies of the Effect of Dimethyl Sulfoxide on Permeability of Dermal Connective Tissue
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 122

5. FORMANEK K. und SUCKERT R., 1966:
Diuretische Wirkung von Dimethyl-Sulfoxyd
DMSO-Symposium 1966, Wien, 21-24

6. GARREN R. jr., 1966:
Uptake and Distribution of Labeled Dimethyl Sulfoxide and its Influence on Nutritive Element Transport in Plants
Annals of the New York Academy of Sciences, 141/1, 127-130

7. GOLDMAN L., IGELMAN I.M. und KITZMILLER K., 1966:
Investigative Studies with Dimethyl Sulfoxide in Dermatology
Annals of the New York Academy of Sciences, 141/1, 428-435

8. zit. nach GOLDMAN L. et al. (EPSTEIN W.: Personal Communication)
Annals of the New York Academy of Sciences, 141/1, 429, 1966

9. GOTTLOB R., 1966:
Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß von Dimethyl-Sulfoxyd auf die Gefäßendothelien
DMSO-Symposium 1966, Wien, 33-35

10. GÜNZEL P. und RICHTER K.-D., 1965:
Verträglichkeit von Dolicur bei langdauernder Anwendung im Tierversuch
DMSO-Symposium 1965, Berlin, 23-26

11. HEIDRICH H.J., GRAMATZKI H. und GIESECKE W., 1966:
Therapieversuche bei Streptokokken- und Staphylokokken-Mastitiden mit intramuskulären Antibioticamedikationen. II. Versuche mit Penäthamat-Hydrojodid = Mamyzin (Veterinaria)
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 79, 103-105

12. HERSCHLER R.J. und JACOB S.W., 1965:
DMSO - a New Drug from Lignin
Tappi 48, Vol. 6, 43 A - 46 A

13. HILD E., 1965:
Praktische Erfahrungen mit Dolicur bei degenerativen Gelenkerkrankungen
DMSO-Symposium 1965, Berlin, 69-71

14. JACOB St.W., 1965:
Zur Pharmakologie und Toxikologie des Dimethyl-Sulfoxyds
DMSO-Symposium 1965, Berlin, 1-10

15. JACOB St.W., BISCHEL M. und HERSCHLER R.J., 1964:
DMSO - a New Concept in Pharmacotherapie
Curr. Ther. Res. 6, 2, 134-135

16. JACOB St.W., BISCHEL M. und HERSCHLER R.J., 1964:
DMSO: Effects on the Permeability of Biologic Membranes (Preliminary Report)
Curr.Ther.Res. 6, 3, 193-198

17. JACOB St.W. und ROSENBAUM E.E., 1966:
DMSO - ein Werturteil nach 2-jähriger klinischer Erfahrung
DMSO-Symposium 1966, Wien, 83-90

18. KIRSCHMER H., 1968:
Untersuchungen über Dimethyl-Sulfoxyd als Penetrationsvermittler von Penicillin am Euter
Vet. Med. Diss. München

19. KITZMILLER K.W., 1966:
DMSO in der Dermatologie
DMSO-Symposium 1966, Wien, 155-158

20. KLIGMAN A.M., 1965:
Topical Pharmacology and Toxicology of Dimethyl Sulfoxide, Part I and II
J. Amer. Med. Ass. 193, 796-804 und 923-928

21. LEAKE C.D., 1966:
Einiges zur Vorgeschichte von DMSO
DMSO-Symposium 1966, Wien, 1-9

22. LEONARD D.D., 1966:
Use of Dimethyl Sulfoxide as a Carrier for Iron in Nutritional Foliar Sprays Applied to Citrus
Annals of the New York Academy of Sciences 141/1, 148-158

23. LÜTH H.F., 1966:
Zur therapeutischen Anwendung von DMSO in der orthopädischen Praxis
DMSO-Symposium 1966, Wien, 95-96

24. MATHIES H., 1965:
Erfahrungen über die Wirkung und Verträglichkeit von Dolicur bei Rheumakranken
DMSO-Symposium 1965, Berlin, 61-65

25. NARULA P.N., 1966:
The Comparative Penetrant-Carrier Action of Dimethyl Sulfoxide and Ethyl Alcohol in vivo
Annals of the New York Academy of Sciences, 141/1 277-278

26. NEUMEYER G., 1965:
Erfahrungen mit Dolicur bei orthopädischen Erkrankungen
DMSO-Symposium 1965, Berlin, 83-84

27. RAMIREZ E. und LUZA S., 1967:
Dimethyl Sulfoxide in the Treatment of Mental Patients
Annals of the New York Academy of Sciences, 141/1, 655-665

28. ROSENBAUM E.E. und JACOB St.W., 1964:
Dimethyl Sulfoxide in Acute Musculo-Sceletal Injuries and Inflammations
I, Dimethyl Sulfoxide in Acute Subdeltoid Bursitis.
Northwest Medicine 63, 167-168
II, Dimethyl Sulfoxide in Rheumatoid Arthritis, Degenerative and Gouty Arthritis.
Northwest Medicine 63, 227-229

29. RUBIN L.F. und BARNETT K.C., 1967:
Ocular Effects of Oral and Dermal Application of Dimethyl Sulfoxide in Animals
Annals of the New York Academy of Sciences 141/1, 333-346

30. SAYTZEFF A., 1867:
zit. aus SCHEFFLER K.-H., Mh.Vet.Med. 24, 604-612

31. SCHEFFLER K.-H., 1969:
DMSO - ein Fortschritt auch für die Veterinärmedizin
Mh.Vet.Med. 24, 604-612

32. SOMMER S. und TAUBERGER G., 1964:
Toxikologische Untersuchungen mit Dimethyl-Sulfoxyd
Arzneimittelforsch. 14, 1050-1053

33. STEINBERG A., 1967:
The Employment of Dimethyl Sulfoxide as an Anti-Inflammatory Agent and Steroid-Transporter in Diversified Clinical Diseases
Annals of the New York Academy of Sciences 141/1, 532-550

34. STORGARDS M.T. und MOHR W., 1962:
Detection of Penicillin and Other Antibiotics
Annual Bulletin of the International Dairy
Federation P. 4

35. SULZBERGER M.B., CORTESE Th.A.jr., FISHMAN L.,
WILEY H.S. und PEYAKOVICH P.S., 1966:
Somme Effects of Dimethyl Sulfoxide on Human
Skin in vivo
Annals of the New York Academy of Sciences 141/1,
437-450

36. WAGENSEIL F., 1967:
Die Ausscheidung verschiedener Penicillinarten
in der Milch nach intramuskulärer Verabreichung beim
Rind
Vet. Med. Diss. München, 24-30

37. WALSER K., 1966:
Experimentelle Untersuchungen über DMSO als Resorptionsvermittler an der Euterhaut von Kühen. Vorläufiger Bericht.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 79, 241-243

38. ZIV G., 1967:
Diffusion in the Udder of Dyes and Antibiotics
Dissolved in Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
Refuah Veterinarith, Quarterly of the Israel
Medical Association 24, 244-235

Ich danke Herrn Prof. Dr. Kurt Walser
für das interessante Thema und für die
Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Lebenslauf

Am 29. November 1943 wurde ich in Sulzbach-Rosenberg in der Oberpfalz als Tochter des Diplom-Kaufmannes Dr. Heinz Engelhardt und seiner Frau Else, geb. Gottschalk, geboren.

Ab Herbst 1950 besuchte ich die Volksschule der Wilhelm-Löhe-Schule in Nürnberg. Nach 4 Jahren wechselte ich in das Realgymnasium derselben Schule über, wo ich im Juni 1963 das Abitur machte.

Von November 1963 bis April 1964 wurde ich in der Bachschule Schloß Rettershof bei Königstein im Taunus als Auslandskorrespondentin für Französisch ausgebildet.

Im Mai 1964 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München mit dem Studium der Tiermedizin. Im Wintersemester 1966 legte ich dort das Physikum ab und bestand nach 9 Semestern im Winter 1968/69 das Staatsexamen.

Das dreimonatige Praktikum machte ich im Sommer 1968 bei Herrn Dr. Rudolf Vogel in Nürnberg. Mit Wirkung vom 31. Juli 1969 erhielt ich die Bestallung als Tierärztin. Von Januar 1969 bis Februar 1970 arbeitete ich als Doktorandin an der Gynäkologischen Tierklinik der Universität München.

Von April bis August 1970 war ich als Assistentin bei Herrn Dr. Paul Artmeier in Augsburg tätig.

Im September 1970 heiratete ich den Tierarzt Jörg Hofmann. Ab November 1970 arbeiten wir beide als Assistenten bei einem Tierarzt in der Schweiz.